



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Significado evolutivo de los genes regulatorios
(*Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*):
un análisis conceptual

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

SOFÍA FLORES FUENTES



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Ricardo Noguera Solano
2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. Datos del alumno

Flores
Fuentes
Sofía
56532430
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
307503831

2. Datos del tutor

Dr.
Ricardo
Noguera
Solano

3. Datos del sinodal 1

Dr.
Víctor Manuel
Valdés
López

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Lourdes Teresa
Agredano
Moreno

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Luis Felipe
Jiménez
García

6. Datos del sinodal 4

Dr.
Ernesto
Soto Reyes
Solís

7. Datos del trabajo escrito

Significado evolutivo de los genes regulatorios (Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4):
un análisis conceptual
152pp
2013

A mi mamá

Agradecimientos

A mi mamá, porque todo lo que soy se lo debo a ella. Por sacarme adelante y por su apoyo. Por su entereza y por ser todo un ejemplo. Por motivarme y haber alimentado mi curiosidad desde chiquita (y explicarme cómo Naty nació por la *vajilla*) y ser una de las responsables de que yo me haya dedicado a la ciencia y, en el futuro, a la divulgación.

A mi papá, por todas sus enseñanzas, las pláticas e historias entretenidas. Por ser un gran referente, por su apoyo y porque siempre tiene las palabras adecuadas. Por ser el papá que necesito.

A Naty, por ser mi BFF. Por ser una gran compañía y un gran apoyo. Porque nunca deja de sorprenderme y porque si hay alguien a quien admiro y le envidio tantas cosas, es a ella.

A Alain, mi carioca querido y mi hermano. El español no me alcanza para decir cuán agradida estoy con la vida por haberme puesto a este hombre en mi camino. No puedo evitar hablar de él con conocidos o desconocidos, porque lo admiro tanto y porque no pasa un día que no piense en él. Por todas las pláticas, las risas ¡y las carcajadas! Los chistes, la compañía y tantas experiencias. Las enseñanzas, porque seguro que nos separaron al nacer (estamos súper conectados), porque adoro a su familia y la mía a él. Porque es mi mejor amigo.

A David, el mejor amigo biólogo de la vida. Porque me escuchó siempre a pesar de haber sonado como disco rayado. Por su compañía y por cuidarme tanto siempre. Por haber hecho un monstruo de mi (jaja), por sus enseñanzas y todas las veces que me hizo morir de risa. Mejor pareja de baile de graduación no pude tener. Gracias por ayudarme a decirle a Carmen que perdió su cadenita.

A Xanat, porque nunca olvidaré cuando me llevó de paseo a Coyoacán (y vimos la rata), justo cuando más lo necesitaba. Nunca pensé conocer a alguien con quien me sintiera tan identificada y que llegara a querer tanto. Por ser mi amiga incondicional, porque nos conocemos re bien a pesar de que casi siempre no tenemos idea una de la otra; y porque, además de Alain, no chismeo tan rico como con ella. Te quiero muchísimo, Xanat; como a nadie en el mundo.

A Mariana, la pituca de mis petacas, porque de ella siempre tengo palabras sabias. Por su enorme cariño, por ser tan divertida y ocurrente. Porque a través de sus decisiones me ha enseñado muchas cosas y porque siempre me ha cuidado. Porque te quiero así, sin dar explicaciones... Wow, qué.

A Pic, a Ikas (Ximena), a Germán y a Beto, porque siempre que nos vemos nos la pasamos comiendo. Porque son mis amigos de toda la vida, con quien me encanta estar. No cabe duda que los amigos son la familia que uno escoge. Porque con ellos me siento apoyada, motivada, querida y esencial. Gracias amigos.

A Abdiel, mi viejito viajero y compañero de tesis (estilo compañera de antojos de embarazada). Gracias por haberme dicho que te encantó el descaro que tuve para acercarme a ti. Porque nos entendemos muy bien. Porque en poquito tiempo te agarré una confianza inigualable y te ganaste mi corazón. Gracias infinitas por tus palabras, todas ellas, desde las más reconfortantes, pasando por las que me pusieron los pelos de punta o las que me sacaron algunas lágrimas, hasta las que me sacaron una sonrisa o de plano la carcajada.

A los juanitos, porque son parte importante de mi experiencia universitaria. El depa estará siempre en mis recuerdos, sobre todo porque hicieron de él también mi depa. Por recibirme siempre con tanto cariño, por cuidarme tanto, alimentarme siempre, y por absolutamente todas las pláticas.

A Javier, por su comprensión y apoyo.

A todos mis madrileños, desde profesores hasta amigos, porque también son culpables de que yo me haya formado en ciencia. Los mejores viajes, muchos de los mejores libros, las mejores discusiones, las mejores canciones, de las experiencias más enriquecedoras en todos los sentidos y de las mejores personas, definitivamente me las dio el Madrid.

A Gala, por su paciencia, por haberme querido y dado tanto. Por su compañía incondicional y por haber tenido el mejor carácter del mundo. A Luca, porque es mi gorda preferida, y a Leo, porque es mi guapo con el alma más bella que he conocido.

A Daniel, por haberme dado tanto. Por todas las experiencias, por todo lo que me permitiste vivir y porque pocas personas me han enseñado tanto como tú. Gracias, porque me permitiste crecer en todas las maneras que alguien puede hacerlo. Porque como te dije, alguien que te hace sentir la alegría más grande y la tristeza más cruda, nunca se olvida ni se deja de querer. Daniel, te llevo en mi corazón.

A la UNAM, por ser mi segunda casa, porque me dio la posibilidad de estudiar la carrera más bella del mundo, por formarme como científica y porque puso en mi camino a personas que marcaron mi vida.

A Ricardo, por toda la paciencia. Por todas las pláticas que enriquecieron mi formación como bióloga y mi capacidad analítica; por toda la enseñanza. Por el apoyo y las palabras de aliento. Nunca dejaré de estar infinitamente agradecida.

A Susana, por ser un referente en mi aprendizaje. Por leerme tanto y siempre hacerme anotaciones extremadamente enriquecedoras. Por las pláticas y tu apoyo. Y si mi redacción no es ni la sombra de lo que era hace algunos semestres, en gran medida te lo debo a ti. Gracias.

A Chu, a Gus, a Lucero, y a todos los biólogos de mi generación o de otras generaciones por acompañarme en este camino y por dejar una huella importante en mi formación. A Lev, a Julio Muñoz, A Fernando Camacho, Rosaura Mayén, a Sigrifrido, a Fernando Fernández, y a todos mis maestros de la carrera, que hicieron de mis clases un deleite y los finales de semestre una pena, porque esto significaba tener que dejar de ir a sus clases.

Al proyecto PAPIME PE208511, por enseñarme a estructurar un proyecto de investigación, a trabajar en equipo, pero sobre todo, porque me acercó con personas extraordinarias.

A Claudia, Adriana, Aline, y Ángel, por haberme dado la posibilidad de formar parte de este equipo de trabajo y de la DGDC. A doña Alice, a Miriam y a Lily, por hacer de este trabajo que amo, algo aún más enriquecedor. Gracias a todos, porque en casi un año he adquirido una cantidad de conocimiento y de experiencia inimaginable. Estoy infinitamente agradecida por el apoyo y la oportunidad.

A Gaby, a Dan, a Ramsés, a Camila, al Ruso y a todos los Cuadrivios, por permitirme formar parte de este proyecto. Gracias por darme la oportunidad de aprender cómo funciona un proyecto editorial, por enseñarme a trabajar en equipo y por darme la posibilidad de desarrollar mis habilidades.

A Pacheco y a Vic, por invitarme y creer en mí para, junto con Emiliano, formar parte de este equipo de trabajo tan bello. Pese a que el proyecto tiene menos de dos meses, no quiero perderme la oportunidad de ponerlos en mis agradecimientos, porque siempre que regrese aquí quiero recordar los primeros días de Historias Cientificales y comparar este momento con el futuro, cuando seamos famosos y hagamos llegar esto a cuanto rincón nos propongamos. Gracias por su entusiasmo y por creer en grande.

A mi familia. A todos los Fuentes y a todos los Flores, porque cada uno me enseña con su ejemplo y me motivan a ser mejor. Gracias por el enorme cariño.

Y a todas las personas que me faltaron, que son parte medular en mi formación y porque me han dado un pedacito de ustedes para que yo sea lo que soy. Los llevo a todos a mi corazón.

Contenido

Prefacio	9
Introducción	10
Capítulo 1. Evo-devo	15
1.1 Orígenes	17
1.2 Evidencias	25
1.2.1 Genes	26
1.2.1.1 Genes homeóticos	28
1.2.2 Regulación	29
1.2.2.1 Regiones regulatorias <i>cis</i>	30
1.2.2.2 Enhancers y promotores	33
1.2.2.3 Factores de transcripción	36
1.2.3 Mecanismos evolutivos del desarrollo	39
1.2.4 Evidencia	42
1.2.4.1 Deuterostomados y protostomados	42
1.2.4.2 Homología	43
1.2.4.3 Espina dorsal (tiempo de expresión)	44
Capítulo 2. Trabajos de Yamanaka y colaboradores	46
2.1 Marco teórico y Antecedentes	46
2.2 Propuesta de investigación	57
2.2 Objetivos	59
2.3 Procedimientos	61
Capítulo 3. Análisis de resultados	67
3.1 Resultados	67
3.1.1 Resultados generales	67
3.1.2 Descripción de resultados particulares	68
3.2 Interpretación de resultados	91
3.3 Trabajos posteriores a Yamanaka y colegas	103
3.4 Análisis de resultados	107
3.4.1 Descripción de <i>Oct3/4</i> , <i>Sox2</i> , <i>c-Myc</i> y <i>Klf4</i>	108
Capítulo 4. Significado evolutivo de los genes	119
4.1 Implicaciones evolutivas de los resultados	119
4.1.1 Pluripotencia, células ES e iPS	119
4.1.2 Respuesta inmune	122
4.1.3 Determinismo genético	123
4.1.4 Regulación	125
Epigenética	125
Factores de transcripción	128
Redes regulatorias	130
Cáncer	137
4.2 Futuro	138
4.3 Los genes <i>Oct3/4</i> , <i>Sox2</i> , <i>c-Myc</i> y <i>Klf4</i> como modelo explicativo	139
Conclusión	143
Referencias	145

Prefacio

Los estudios de la biología evolutiva del desarrollo están enfocados en identificar los procesos del desarrollo en diferentes linajes, para así profundizar en los mecanismos evolutivos ligados a la transformación de las especies; todo esto, desde el estudio de los genes que actúan durante este momento de la vida. La investigación realizada por Shinya Yamanaka y colegas sobre la desdiferenciación celular, y publicada en dos artículos (2006 y 2007), desembocó en la producción de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) con sólo cuatro factores de transcripción. Las aplicaciones de esta tecnología, la de las iPSCs, son evidentes en muchos campos de conocimiento, como son el científico, el tecnológico, el clínico-médico y el ético. Desde la biología ¿qué características de los cuatro genes involucrados en la inducción de células madre pluripotente tiene implicaciones evolutivas?. En este trabajo se discuten las implicaciones evolutivas de *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4* para generar este tipo de células; no existen trabajos que traten este tema. Con la descripción de los trabajos realizados y la caracterización de los cuatro factores, se entenderá la relación de éstos cuatro genes con la teoría evolutiva del desarrollo. En análisis permitirá comprender que la teoría evolutiva del desarrollo da evidencias del proceso evolutivo como un hecho, y que estos cuatro genes son prueba de la evolución dentro del grupo de los animales; éstos tienen importancia evolutiva ya que pueden servir como modelo explicativo del desarrollo para identificar relaciones filogenéticas entre linajes celulares, entre especies y entre los distintos grupos de animales.

Introducción

El objetivo general de este trabajo es discutir, a partir de la investigación de Shinya Yamanaka¹ y colaboradores, qué implicaciones evolutivas tienen los genes *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc*, y *Klf4*, que generan células madre pluripotentes inducidas.

Particularmente, se establecerán las características de estos genes regulatorios - desde su estructura hasta las redes regulatorias que conforman- y los fenómenos epigenéticos relevantes para los procesos celulares llevados a cabo durante el desarrollo. Se definirá la función que desempeña cada uno de los cuatro genes durante el desarrollo del ratón y del humano; así como dilucidar las razones por las cuales son necesarios para transformar una célula diferenciada a una pluripotente. Finalmente, se entenderá la relación de éstos cuatro genes con la teoría evolutiva del desarrollo.

Desde que John Gurdon (1962) generó renacuajos a partir de huevos que recibieron el núcleo de células epiteliales intestinales de ranas adultas y demostró que las células diferenciadas contienen toda la información genética necesaria para el desarrollo de organismos completos, comenzó la era de las células reprogramadas genéticamente. Esto desembocó en la producción de iPSCs (Célula madre pluripotente inducida), por Shinya Yamanaka, Kazutoshi Takahashi y el resto de su equipo de trabajo (2006, 2007).

El autor japonés, junto con sus colegas, publicó en 2006 su primer trabajo respecto a estas células. En él, se detalla la metodología para reprogramar células diferenciadas de fibroblasto de ratón a células con características embrionarias, a partir de la introducción de transgenes (transducción retroviral) para la sobre expresión de cuatro genes (Takahashi, K. y Yamanaka, S., 2006). En 2007, reportó una aproximación similar a partir de fibroblastos humanos (Takahashi, K. *et al.*, 2007).

Además de la investigación de Gurdon, Yamanaka pudo llegar a la producción de células inducidas gracias a la desarrollo de otras dos líneas de investigación surgidas con anterioridad (Yamanaka, S., 2012), que involucran el registro de factores de transcripción

¹ Shinya Yamanaka nació en Osaka, Japón, en 1962. Obtuvo el título de médico en 1987 por la Universidad de Kobe, en Japón, y se entrenó como cirujano ortopedista antes de dedicarse a la investigación básica. Yamanaka recibió el grado de doctor por la Universidad de la Ciudad de Osaka, en 1993. Recibió en 2012 el Premio Nobel en Fisiología o Medicina, junto con John Gurdon, por el descubrimiento de que las células maduras pueden ser reprogramadas para convertirse en pluripotentes. Actualmente es profesor de la Universidad de Kyoto, Japón, donde dirige el Centro para la Investigación y Aplicación de las células iPS. (Fuente: nobelprize.org)

maestros (Schneuwly, S. 1987) y la generación de células ES (Embryonic Stem Cell) de ratón *in vitro* (Evans, M. J. y Kaufman, M. H., 1981).

Como consecuencia, surgió la pregunta de ¿por qué las células de un embrión tienen la capacidad de convertirse en cualquier tejido del organismo? A partir de esto, Yamanaka hipotetizó que es la combinación de múltiples factores en oocitos o células madre embrionarias lo que reprograma a las células somáticas a un estado pluripotente (Yamanaka, S., 2012). Con la investigación en ratones y, posteriormente, con células humanas, llegó a la conclusión de que la sobreexpresión de cuatro genes son suficientes para inducir la pluripotencia en las células diferenciadas: *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*. Lo interesante, además del pequeño número de genes, es que estos cuatro son factores de transcripción. Los factores de transcripción son moléculas que se unen a secuencias específicas de DNA que modifican la expresión de un gen específico. La transformación en los genes que actúan durante el desarrollo genera modificaciones morfológicas; esto es el principal objeto de estudio de la biología evolutiva del desarrollo.

Desde el último cuarto de siglo pasado, los genes del desarrollo comenzaron a ser objeto de estudio como modelo evolutivo (De Robertis, M., 2008); de acuerdo con C. Goodman y B. Couhlin (2000), desde la década de los noventa del siglo pasado, los biólogos comenzaron a utilizar patrones de expresión de genes del desarrollo para explicar la evolución de los taxones.

El conjunto de genes de cualquier organismo está dividido en dos partes funcionales: los genes estructurales y los genes regulatorios (Ridley, M. 2004). Los genes regulatorios son aquellos que codifican para moléculas que modulan la expresión de otros genes, sean estructurales o regulatorios; estudios con elementos regulatorios, como promotores o *enhancers*, han revelado cómo es que las redes regulatorias y sus efectores aseguran que un gen se active transcripcionalmente en el momento y a los niveles adecuados (Guruharsha, K. y Vijayraghavan, K., 2004). Se ha especulado que las similitudes entre diferentes especies está dada por la función de las secuencias regulatorias, las cuales determinan el tiempo y el patrón de la expresión genética. Estos patrones de expresión genética definen una diversidad de funciones celulares durante el desarrollo, la cual permite también, a través de la regulación de expresión genética y por mecanismos

epigenéticos, un refinamiento futuro de rutas de desarrollo en cada organismo (Guruharsha, K. y Vijayraghavan, K., 2004).

Además, los genes que regulan el desarrollo, se dividen en dos grupos: genes que codifican para factores de transcripción y genes que codifican para proteínas de señalización (Ridley, M. 2004). Los factores de transcripción son moléculas que se unen a secuencias específicas de DNA que modifican la expresión de un gen específico. La transformación en los genes que actúan durante el desarrollo genera modificaciones morfológicas: esto es el principal objeto de estudio de la biología evolutiva del desarrollo.

Existen tres mecanismos del desarrollo que, se piensa, han contribuido para que se hayan dado cambios evolutivos en la morfología de las especies (Ridley, M. 2004). El primero es el cambio en la expresión de los genes; el segundo es el cambio en el tipo de genes que son activados o reprimidos por factores de transcripción que no han cambiado, lo que se conoce como *enhancers*; el tercero es el cambio en los factores de transcripción, los cuales han cambiado su interacción con secuencias específicas de DNA.

Además, de acuerdo con Ridley, Britten (1969) y Davidson (1971) sugieren que la reorganización dentro de las redes de genes regulatorios puede causar cambios evolutivos importantes (Ridley, M. 2004). Proponen que la evolución morfológica es resultado de cambios en genes *integradores* (factores de transcripción) y *receptores* (promotores) y no tanto por los genes *productores* (genes estructurales) (Hoekstra, H. y Coyne, J. 2007).

Actualmente, se sabe que los elementos regulatorios *cis*, que son los *enhancers* y *promotores*, entre otros, y que controlan el desarrollo y la fisiología de las células, son vistos no sólo como el blanco más probable para la evolución de la regulación genética sino también como el sitio más importante de cambio evolutivo, al menos para lo que se refiere con morfología (Hoekstra, H y Coyne, J., 2007).

Por las implicaciones evolutivas de los factores moleculares de las células madre embrionarias, la investigación de Yamanaka y colegas, junto con la de Gurdon, ha cambiado muchos paradigmas, hecho reconocido con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina del 2012. Las consecuencias de todo esto no sólo son relevantes para el quehacer científico o tecnológico, sino que también permea aspectos éticos, económicos, políticos y sociales.

La importancia del estudio de las células pluripotentes en el terreno médico radica en los alcances de esta tecnología y en la amplia gama de posibles aplicaciones. Esto es, por ejemplo, en modelos para estudiar el desarrollo de enfermedades, en la medicina regenerativa, en estudios sobre mecanismos de reprogramación, en ciencia básica y, desde luego, en estudios y análisis evolutivos.

Una de las ventajas de la tecnología de las iPSCs es su simplicidad y reproductibilidad (Yamanaka, S., 2012) sin embargo, la eficiencia del proceso se mantiene bajo, ya que menos del 1% de los fibroblastos transfectados se convierten en células madre inducidas. El uso de retrovirus y lentivirus causa mutagénesis. Por tal motivo, se han buscado alternativas diferentes, como plásmidos, adenovirus, RNAs sintetizados y proteínas. Por lo pronto, *Oct3/4* y *c-Myc* están asociados con la generación de tumores cancerígenos (Quinn, M. y Findlay, J., 2012; Yamanaka, S., 2012).

Sin embargo, el análisis de la producción de iPSCs se ha enfocado en aspectos biotecnológicos y metodológicos, y muy poco en el aspecto conceptual. La teoría evolutiva del desarrollo tiene, desde el enfoque genético de ésta, el poder explicativo para el análisis de estos cuatro genes en la reprogramación celular ya que explica la relación entre la evolución y el desarrollo y, por tanto, permite comprender por qué las iPSCs tienen características particulares dependiendo de la especie; por qué los cuatro genes utilizados, de los 24 iniciales, son regulatorios y no estructurales; por qué los fenotipos entre iPSCs y ESC (Células madre embrionarias; por sus vocablos en inglés *Embryonic Stem Cells*) han sido similares en los resultados de diferentes estudios pero genética y epigenéticamente, son diferentes; qué consecuencias tendrá esto a lo largo de varias generaciones celulares y de organismos.

Analizar en términos teóricos, las implicaciones evolutivas de los cuatro genes en la producción de iPSCs, es sumamente importante, ya que incide en una mayor apertura explicativa de los procesos biológicos y en argumentaciones más completas, que contemplen casualidades y causalidades; a la fecha no existe un trabajo que analice en términos evolutivos la inducción de células madre. Es muy probablemente que una gran cantidad de problemas que aquejan a la humanidad se puedan resolver con esta tecnología, en tanto que el trabajo de Yamanaka y colegas es una gran contribución para generar

conocimiento, aunque las consecuencias derivadas pueden acrecentar algunas complicaciones ya existentes o crear nuevos planteamientos.

En los siguientes capítulos de esta tesis, se realiza un análisis teórico de los trabajos de Yamanaka y colegas en torno a su investigación con células iPSCs en ratones y humanos; un análisis crítico de los argumentos que se han elaborado en relación a estas investigaciones, con la intención de aportar elementos que extiendan el espacio a las explicaciones evolutivas, tomando como referencia estas innovaciones metodológicas y biotecnológicas.

En el primer capítulo se explica la teoría evolutiva del desarrollo, sus orígenes y cómo a partir de evidencias morfológicas, y principalmente moleculares, las explicaciones evolutivas han sido integradas a este proceso. Este capítulo sirve como una plataforma teórica para sustentar las implicaciones evolutivas del trabajo de Yamanaka y colegas. En el segundo capítulo se analiza los antecedentes a la investigación del grupo de investigación liderado por el científico japonés, los cuales sirvieron como marco teórico para su desarrollo. Aunado a esto, se mencionan y analizan las hipótesis, objetivos generales y particulares, y los métodos empleados en los artículos de inducción de pluripotencia en células diferenciadas de ratón y humano. En el tercer capítulo se enumeran y analizan los resultados obtenidos en estos dos trabajos, y las implicaciones de éstos. Finalmente, en el cuarto capítulo se discuten las implicaciones y el significado evolutivo de esta investigación. De la misma manera, se analizan los estudios posteriores que surgieron de ambos trabajos y el futuro de las líneas de investigación.

Capítulo 1: Evo-devo

La biología evolutiva del desarrollo -también conocida como *evo-devo*, *devo-evo* o *EDB*- (Hall, B., 2003), es el estudio de las relaciones entre la evolución y el desarrollo (Ridley, M., 2004). En este capítulo se revisa la teoría evolutiva del desarrollo, desde sus antecedentes hasta las evidencias con las que cuenta, como son las homologías. El objetivo es mostrar la teoría que está como telón de fondo en el trabajo de Yamanaka y colegas.

Cuando se da el proceso evolutivo, lo que ocurre es que una especie cambia a otra, por lo que los científicos han estudiado desde ya hace tiempo que si la evolución implica modificaciones morfológicas, en el desarrollo estos cambios también deben ocurrir. En la morfología, las transformaciones evolutivas son resultado de la genética del desarrollo y de la existencia de cambios evolutivos durante este proceso, es decir que la evolución ocurre a través de cambios heredables en el desarrollo del organismo que se manifiestan como cambios en la expresión genética del desarrollo orgánico (García, T. 2005). Por tal motivo, es necesario comprender la evolución del desarrollo para poder entender la evolución morfológica.

Los biólogos evolutivos del desarrollo buscan dilucidar cómo es que los organismos evolucionan y cambian su forma y figura a partir de la identificación de mecanismos del desarrollo, los cuales generan los cambios evolutivos en el fenotipo de los organismos (Ridley, M. 2004. p. 572).

La genética, sin lugar a dudas tiene un peso primordial en evo-devo pero, por sí misma, no nos permite entender cómo es que surgen los fenotipos. Es por esto que evo-devo compromete a todo aquello que esté relacionado entre el genotipo y el fenotipo (Hall, B. 2003. p. 492). Además, es resultado de una larga investigación para entender la relación entre la transformación de un organismo en una sola generación (desarrollo, ontogenia, cambio ontogenético) y aquellas transformaciones que ocurren entre generaciones (evolución, filogenia, cambio filogenético) (Hall, B. 2003. p. 492). El objetivo de la investigación evo-devo no es sólo describir el desarrollo en las especies, sino también dar principios generales por los cuales la evolución morfológica puede ocurrir en todos los animales (Hughes, C. y Kaufman, T. 2002).

De acuerdo con Tomás García (2005), los objetivos de Evo-devo son cinco:

- Evolución del desarrollo. Estudio comparativo de características a diferentes niveles de la jerarquía biológica (genes, redes genéticas, patrones de expresión, tejidos, etc.)
- Establecimiento de homologías. Los patrones de expresión génica pueden resolver los problemas que se presentan en el reconocimiento de homologías.
- Mapa genotipo-fenotipo. Para entender la dinámica de la adaptación, es necesario entender la arquitectura del desarrollo a nivel genético. Las diferencias entre especies puede explicarse por medio de su diferente arquitectura de desarrollo.
- Patrones de evolución fenotípica. Los mecanismos de desarrollo pueden constreñir o facilitar el cambio evolutivo. Un objetivo es determinar si las constricciones de desarrollo influyen en la diversificación evolutiva.
- Innovaciones evolutivas. La Evo-devo trata de dar cuenta de los mecanismos del desarrollo responsables del origen de nuevos rasgos.

Para cumplir con el objetivo de esta tesis, nos centraremos en la evolución del desarrollo y en el mapa genotipo-fenotipo.

Scott Gilbert menciona que evo-devo es resultado de dos agentes intrínsecos y extrínsecos. Por un lado, la evolución se enfoca en la contingencia y en factores ambientales que seleccionan ciertas interacciones sobre otras. Por su parte, el desarrollo se enfoca en las interacciones epigenéticas y el surgimiento de fenotipos a partir de dichas interacciones (Gilbert, S. 2003. p. 467). Así mismo, Lewis Wolpert (2002) menciona que, mientras los estudios de desarrollo se basan en modelos de sistemas y experimentos, la biología evolutiva utiliza metodología comparativa para describir e investigar explicaciones de los patrones de diversidad y cambio del pasado y presente (Wolpert, L. 2002. p. 494)

Evo-devo, como teoría, involucra novedades:

- La idea que los planes corporales (phyla) surgen por mutaciones que distinguen poblaciones o especies.
- La evolución está relacionada con la transformación de módulos del desarrollo que son relativamente independientes de otros de manera genética.
- La evolución, por sí misma, establece rasgos que promueven la evolución futura, es decir, hace *evolucionables* a los organismos (retomaré el término más adelante).
- La evolución más importante está relacionada con alteraciones en la regulación de los genes más que en su estructura (Hoekstra, H. y Coyne, J. 2007).

García (2005) sugiere que Evo-devo se dedica a la explicación de la evolución y de los procesos de desarrollo de la misma forma que se explican los cambios en poblaciones de organismos adultos. Sin embargo, el mismo autor menciona que existen fenómenos fundamentales que no se integran en este esquema explicativo como son: 1) cada organismo presenta un proceso particular de desarrollo por lo que ciertas variantes son más “accesibles” que otras, definiendo el rango de variación sobre el que la selección puede actuar. El desarrollo es construcción, producto y causa del proceso evolutivo. 2) la evolución de los mecanismos de desarrollo no puede entenderse únicamente a nivel genético². El desarrollo es un proceso jerárquico emergente en el que aparecen nuevos mecanismos de desarrollo, especialmente importantes para entender el origen de novedades evolutivas. 3) la concepción heredada ofrece una interpretación del cambio evolutivo fundamentalmente externalista, es decir, la evolución es un proceso de adaptación de las partes de un organismo a las presiones del entorno.

Debido a que los expertos del tema buscan entender cómo las alteraciones en el funcionamiento y en la expresión genética lleva a cambios en la forma del organismo, se ha estudiado genes que controlan el desarrollo para comprender cómo es que éstos se modifican entre especies, permitiendo identificar relaciones evolutivas y de desarrollo entre éstas. El origen de este grupo de genes ha abierto la puerta al entendimiento de cómo ocurre la evolución.

1.1 Orígenes

La biología evolutiva del desarrollo tiene sus orígenes en la morfología evolutiva de finales del Siglo XIX (Gilbert, S. 2003. p. 468). Desde entonces y hasta principios del XX, los biólogos reconocieron que el estudio del desarrollo es crucial para entender la evolución morfológica (Ridley, M. 2004. p. 573).

Hall (Hall, B. 2003. p. 491) menciona que evo-devo inicia, en realidad, desde la morfología evolutiva comparativa o embriología evolutiva que surgió con la publicación de *El origen de las especies* (1859) de Charles Darwin. El inglés sostuvo que la embriología

² García (2005) menciona que a pesar de que en Evo-devo se toman en cuenta recursos genéticos y no-genéticos, éstos últimos se ven reducidos por lo general a elementos estructurales heredables de los genes, como patrones de metilación, impronta genética o elementos citoplasmáticos producto de genes maternos.

podría dar la mejor evidencia de la evolución, lo cual fomentó que muchos morfológicos del último tercio del siglo XIX comenzaran con la embriología comparativa. Darwin, en 1859, escribió “es generalmente reconocido que todos los seres orgánicos han sido formados bajo dos grandes leyes – unidad del tipo y condiciones de la existencia. Mientras que la selección natural explica la adaptación de las <<oficinas de la existencia>>, las homologías embriónicas explican la unidad del tipo.” (Gilbert, S. 2003. p 468). Con esto, Darwin explica las similitudes a través de la descendencia a partir de un ancestro común y las diferencias surgidas por el ambiente a través de la selección natural. Su conclusión en *El origen* fue “La comunidad de las estructuras embriónicas revela la comunidad de la descendencia.” (Gilbert, S. 2003. p 468).

El biólogo alemán Ernst Haeckel (1834-1919), reconocido por sus estudios de embriones de diferentes animales y, sobre todo, por la famosa frase “la ontogenia recapitula la filogenia” (Gilbert, S. 2003. p 468) probablemente fue el investigador más destacado en análisis de la evolución como clave para el desarrollo. Su trabajo hace referencia a la teoría de la recapitulación, la cual sostenía que los estadios del desarrollo de un organismo corresponden con la historia filogenética de las especies, es decir que cada estadio del desarrollo recapitula un estadio ancestral en la historia evolutiva de las especies. Por ejemplo, acorde con esta teoría, los mamíferos evolucionamos de un pez ancestral pues los embriones presentan, en sus primeros estadios, branquias.

Para Haeckel, la evolución ocurría en un sentido: los cambios se daban únicamente en los adultos y nuevos estadios se agregaban al final de la secuencia evolutiva embrionaria ya existente. Según él, el trabajo de Darwin incluía el desarrollo progresivo de las especies, pues como decía, el desarrollo y progreso era lo que caracterizaba a la evolución (Gilbert, S. 2003. p 469).

Una de sus aportaciones más importantes fue la propuesta del paralelismo causal entre el desarrollo embrionario y la filogenia. Con su ley biogenética, creía que el origen sucesivo o progresivo de nuevas especies estaba basado en las mismas leyes que el origen sucesivo y progresivo de estructuras embrionarias. Es así como sostenía que el desarrollo de especies avanzadas pasaba a través de estadios representados en adultos de especies más primitivas (Gilbert, S. 2003. p 469).

Gilbert menciona que Stephen J. Gould (1941-2002) analizó tres principios de la ley biogenética de Haeckel (Gilbert, S. 2003. p 469). Primero, existe una *ley de correspondencia*. Por ejemplo, creía que el cigoto humano en blástula era la representación del estadio adulto de los protistas coloniales. Segundo, existe una *ley de adición terminal*. El embrión evolucionó en nuevas especies al agregar un paso al final del anterior, es decir que, el humano por ejemplo, evolucionó cuando el embrión del siguiente simio más complejo agregó un nuevo estadio (Esta concepción de la evolución corresponde más a una escalera que a un árbol). Finalmente, existe una *ley de truncamiento*. Esta ley sostiene que el estadio de desarrollo anterior puede ser escorzado, y es necesario para prevenir que el tiempo de gestación sea muy grande.

A finales del Siglo XIX, la embriología descriptiva estaba en decadencia y ésta dio paso al nacimiento de la embriología experimental, la cual fue anunciada en 1894 por el alumno de Haeckel, Wilhelm Roux (1850-1924). Con esto, Roux rompió muchas de los lazos que existían entre la embriología y biología evolutiva y ecológica, pues por ejemplo, sostenía que los mecanismos de desarrollo ontogenéticos y filogenéticos tienden a ser perfeccionados. Creía que investigar los mecanismos de desarrollo de embriones individuales (la ontogenia) era más rápido que el estudio filogenético. Como menciona Gilbert, Nyarth demostró en 1995 que mucho del trabajo pionero en embriología experimental fue llevado a cabo por morfólogos que estaban interesados en determinar los factores ambientales causales del desarrollo (Gilbert, S. 2003. p 473).

A pesar del gran seguimiento y apoyo que tuvo la teoría de la recapitulación, a partir de la década de los 20's del siglo pasado, muchos biólogos comenzaron a aceptar una opción más amplia: la evolución generalmente actúa por adición terminal demostrando que la recapitulación existe. Sin embargo, también es posible que otros estadios se modifiquen, alterando el tiempo reproductivo y que el desarrollo somático se altere. (Ridley, M. 2004. p. 576).

Ahora, la heterocronía son los cambios evolutivos en el tiempo y velocidad de los diferentes procesos de desarrollo. De hecho, el tiempo de reproducción cambia a desarrollo somático. La importancia de la heterocronía en la embriología evolutiva fue desarrollada por uno de los biólogos descriptivos más importantes, quien buscó procesos en el desarrollo embrionario que pudieran explicar la evolución morfológica: Sir Gavin de Beer (1899-

1972). De Beer demostró que los caracteres cambian su orden de aparición en la ontogenia de embriones descendientes comparados con sus ancestros y algunas características persisten en una duración más grande que otras. El tiempo es crítico y los cambios en el tiempo de los eventos puede llevar a nuevas características evolutivas (Gilbert, S. 2003. p. 470). Otra de sus contribuciones, fue el concepto de homología. Él sostuvo que las estructuras homólogas pueden aparecer por diferentes mecanismos; el hecho de que se compartan capas germinales o genes no constituye una prueba de homología.

En la década de los 30's del siglo pasado, Thomas Hunt Morgan (1866-1945) separó de manera formal a la genética de la embriología, al considerar a la primera como el único acercamiento científico válido al estudio de la evolución. Morgan pensaba que genes nuevos son los responsables de cambiar el patrón del desarrollo (Gilbert. S. 2003. p. 471). Sin embargo, cometió el error de no incluir el programa embriológico completo, el que contempla a la heterocronía, por ejemplo. Para Gilbert, antes de la síntesis moderna, estaría la síntesis *no* moderna, la cual integraba a la embriología con la evolución. La síntesis moderna, cambió a la embriología por la genética para desarrollar sus explicaciones. (Gilbert, S. 2003. p. 471).

La síntesis moderna dejó fuera a la embriología. A pesar del antagonismo entre la embriología y la genética, existieron algunos científicos que intentaron integrar a la genética con la embriología y la evolución. Ejemplo de esto es que algunos de los fundadores de la síntesis moderna estaban de acuerdo con introducir el fenómeno del desarrollo a la teoría. Sewall Wright (1889-1988), por ejemplo, estudió la polidactilia en los cerdos de guinea. Ledyard Stebbins (1906-2000) desarrolló un modelo sobre la evolución de las plantas, el cual contenía numerosos ejemplos sobre cómo los genes producen variación seleccionable por su influencia en la fisiología del desarrollo. Sin embargo, Richard Goldschmidt (1878- 1958) creó su versión sobre la biología evolutiva del desarrollo, a la que llamó *genética fisiológica*, pues criticó a la síntesis moderna al no estar de acuerdo en que pequeños cambios genéticos fueran suficientes para generar estructuras novedosas. Consideraba que los cambios evolutivos ocurrían sólo por cambios heredables en los genes que regulan el desarrollo pues éstos afectan las velocidades de desarrollo y procesos fisiológicos (Hall, B. 2003. p. 492). Incluso, creó dos modelos para describir la actividad genética, el desarrollo y la dinámica evolutiva. En su primer modelo, sustentó que

las nuevas especies se originan como monstruos esperanzados, los cuales resultan de mutaciones en locus relacionados con el desarrollo, lo que él llamó *macromutaciones del desarrollo*. En su segundo modelo, argumentó que los rearrreglos cromosómicos o mutaciones sistémicas podrían tener el efecto de muchas macromutaciones del desarrollo y causar cambios fenotípicos enormes.

Para Goldschmidt, los procesos regulatorios del desarrollo liberaban la necesidad de miles de genes modificadores y por tal motivo, intentó convencer a los evolucionistas de que la evolución no es sólo un problema estadístico genético sino que es una de las potencialidades del desarrollo del organismo.

Debido a que para la época de Goldschmidt no existía una teoría de actividad genética, existieron muchos intentos de unir a la embriología con la evolución sin necesidad de utilizar a los genes como lenguaje común. Dos investigadores que llevaron esta actividad a cabo fueron Ivan Ivanovich Schmalhausen (1884- 1963) y Conrad Hal Waddington (1905- 1975).

Waddington, quien era investigador de genética, embriología experimental y biología evolutiva, identificó que el acercamiento entre la genética y la evolución culminó con la síntesis moderna, y que, a pesar de que las matemáticas le daban a esta teoría un gran prestigio, no le daba ninguna notable expresión cuantitativa en la evolución de las especies (Gilbert, S. 2003. p. 472). Lo que Waddington señaló con su investigación en la teoría sintética y en las fallas (él resaltó tres fallas importantes) que ésta tiene, es que se debe tener un estudio evolutivo de los procesos que dan desde el genotipo hasta el fenotipo, o lo que también llamó como *paisaje epigenético*. Para él, los cambios en los genotipos sólo tienen efectos en la evolución si llevan consigo alteraciones en el proceso epigenético por el cual los fenotipos son desarrollados. (Gilbert, S. 2003. p. 472).

Otro investigador que aportó a la discusión entre ontogenia y filogenia fue Yeshayahu Leibowitz (1903-1994), quien concluyó que la síntesis estaba incompleta en tanto que no integraba los datos de la embriología experimental en una teoría que habla de cómo se genera el fenotipo. Carroll (2008) menciona que con la síntesis moderna de la teoría evolutiva se incluyó a la genética, a la paleontología y a la sistemática, pero poco se dijo del efecto de los genes en el desarrollo, dejando con eso a un lado a la evolución de la

forma; a pesar del trabajo de Aldous Huxley (1894-1963), embriología y genética del desarrollo no jugaron papel alguno en la conformación de esta síntesis.

Según Gilbert (Gilbert, S. 2003. p. 467), la biología del desarrollo ha experimentado dos revoluciones: la primera inició en la década de los setentas del siglo pasado cuando se comenzó a dar explicaciones por las cuales el mecanismo de las instrucciones genéticas especifican fenotipos a partir del uso de la tecnología del DNA recombinante. La segunda fase comenzó en la misma época pero, según el autor, creció de una manera más lenta. Con la aplicación de las tecnologías de DNA recombinante y otras nuevas, como la bioinformática o la genómica, se ha llevado a la biología del desarrollo a áreas que estaban abandonadas como la evolución, la ecología y la medicina. La biología del desarrollo no sólo ha integrado a estas tres áreas de estudio, sino que han sido integradas por la biología evolutiva del desarrollo. Si esta nueva integración es exitosa, podría constituir una revolución en nuestra manera de pensar acerca de los orígenes de la biodiversidad (Gilbert, S. 2003. p. 467).

En la década de los 80's, Gilbert menciona que se forjaron algunos de los paradigmas que se utilizan actualmente (Gilbert, S. 2003. p. 473). Uno de los más productivos ha sido el programa genético de desarrollo para evo-devo. Éste, a su vez, tiene tres proyectos:

- El primero se enfoca en las similitudes que se encuentran en los genes regulatorios del desarrollo de los animales, lo que incluye a los genes *Homeóticos* quienes regulan el eje antero-posterior; los genes *Pax6* quienes especifican los fotoreceptores y el desarrollo del ojo; *Nkx2.5* quienes dan las órdenes para la formación del corazón.
- El segundo proyecto estudia las modificaciones de estas instrucciones en tanto que forma clados que difieren uno de otro. El enfoque en este se encuentra en las diferencias genéticas de genes regulatorios, sus objetivos y sus patrones espacio-temporal de expresión.
- El tercer proyecto estudia las variaciones de los genes y su expresión en las poblaciones. Éste último promete ligar a la biología evolutiva del desarrollo con las áreas más tradicionales de la biología evolutiva debido a que su objetivo es estudiar las variaciones fenotípicas producto de las mutaciones en genes regulatorios.

Carroll menciona que las cosas comenzaron a cambiar cuando se descubrió la *homeobox*, secuencia que fue identificada en bastantes loci relacionados con la formación de segmentos e identidad de la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*, y posteriormente fue encontrado en agrupaciones de genes relacionados (*homeóticos*) en vertebrados y demás animales. (Carroll, S. 2008).

Desde la década de los 90's del siglo pasado, los biólogos comenzaron a utilizar patrones de expresión de genes del desarrollo de individuos para explicar cómo es que los grupos habían evolucionado, pero la unión oficial entre la biología del desarrollo y estudios evolutivos tuvo lugar en 1999 cuando la biología evolutiva del desarrollo tuvo su propia división en la Sociedad para la Biología Integrativa y Comparativa (*Society for Integrative and Comparative*, SICB) (Goodman, C. y Coughlin, B. 2000. p. 4424), y en el 2000 dos revistas publicaron los resultados de investigación sobre evo-devo. Es por esto que Gilbert considera el inicio del Siglo XXI como el nacimiento de evo-devo. De la misma manera, el autor considera que, si este año fue el nacimiento de la teoría, 1977 fue su concepción debido a que se publicaron tres artículos sobre la biología evolutiva del desarrollo: *Ontogeny and Phylogeny* de Stephen J. Gould, *Evolution by tinkering* de François Jacob (1920-) y las técnicas para la secuenciación del DNA de Maxam y Gilbert.

Hall, por su parte, menciona que hay dos grupos de investigadores que aceptan el nacimiento de evo-devo. Para el primero, concuerda con Gilbert en tanto reconoce a *Ontogeny and Phylogeny* de Gould en 1977 al recordar la importancia de la heterocronía como un mecanismo de cambio evolutivo. Para el segundo grupo, evo-devo nació con el descubrimiento de los genes *Homeóticos* pues con esto, se igualó a la biología del desarrollo con genética molecular, además de que con esto se identificaron genes de señalización conservados como el mecanismo evolutivo de desarrollo más importante (Hall, B. 2003. p. 491).

Actualmente, la biología médica del desarrollo se ha centrado en el estudio de la embriología humana. Cuando se aplica la biología médica del desarrollo a evo-devo surgen dos preguntas principales ¿qué cambios en el desarrollo han generado a *Homo sapiens sapiens*? y ¿cuál es la fuente de variación dentro de las poblaciones humanas?. Según Gilbert, la investigación de Allan Wilson (1934-1991) ha demostrado que los humanos y

simios son morfológicamente diferentes pero tienen genes que codifican para proteínas muy similares, lo cual es un elemento para iniciar evo-devo.

Su investigación propone que los genes regulatorios son críticos en la creación de diferencias dentro de las poblaciones de primates y estas diferencias son posiblemente críticas en el origen de la especie humana (Gilbert, S. 2003. p. 475). Gilbert también menciona que cambios cuantitativos en la expresión de genes regulatorios durante el desarrollo son, probablemente, la mayor fuente de variación en los humanos. Las mutaciones en pequeña escala contribuyen con grandes variaciones en las velocidades de transcripción a lo largo del genoma y, por tanto, en la variación humana (Gilbert, S. 2003. p. 475).

Por ejemplo, Rockman y colegas encontraron en 2003 que una sustitución simple en el *enhancer* del gen regulatorio que codifica para interleucina 4 (IL4), crea un nuevo sitio de unión para el factor de transcripción NFAT, provocando que se triplique la síntesis de interleucina 4. Al crearse un nuevo sitio de unión como consecuencia de la mutación, el linaje de los humanos se separó de los simios, creando un polimorfismo³ en la población humana. Las personas que portan este polimorfismo son más propensas a sufrir asma, entre otros síntomas respiratorios. Otro ejemplo importante entre genética médica y evo-devo es el gen que codifica para el factor de transcripción de FoxP2, que por la diferencia de dos aminoácidos entre humanos y simios, tiene repercusiones tajantes, en tanto que este gen es crítico para habilidades cognitivas y motoras relacionadas con el habla.

Con todo este enorme catálogo de información sobre polimorfismos clínicos, la biología médica del desarrollo se ha vuelto sumamente importante en la biología evolutiva del desarrollo.

Gilbert menciona que en conjunto evo-devo, la biología ecológica del desarrollo y la biología médica del desarrollo, están volviendo más inclusiva a la biología evolutiva del desarrollo, permitiendo que se revitalice y se den más respuestas a preguntas sumamente importantes que anteriormente no se habían podido contestar, llegando a puntos tan críticos como el entendimiento de la formación de la biodiversidad en la Tierra.

³ De acuerdo con el Oxford Dictionary, en biología se entiende como polimorfismo a la existencia de diferentes formas entre los miembros de una población. En genética es la presencia de variación a este nivel dentro de la población, sobre la cual opera la selección natural. (Fuente: oxforddictionaries.com).

1.2 Evidencias

Todas las células se desarrollan a partir de la información genética que existe en ellas por lo que hay una relación sumamente estrecha entre este proceso y el genoma. La biología evolutiva del desarrollo tiene evidencias y principios basados en su principal objeto de estudio: los genes que actúan durante el desarrollo. Su transformación, en consecuencia, genera modificaciones morfológicas.

Existen tres mecanismos del desarrollo que, se piensa, han contribuido para que se hayan dado cambios evolutivos en la morfología de las especies.

- El primero es el cambio en la expresión espacial de los genes.
- El segundo es el cambio en el tipo de genes que son activados o reprimidos por factores de transcripción que no han cambiado, lo que se conoce como *enhancers*.
- Y tercero, el cambio en los factores de transcripción, los cuales han cambiado su interacción con los *enhancers* (Ridley, M. 2004).

Carroll (2008) menciona que existen ocho principios derivados de observaciones de biología evolutiva y molecular del desarrollo, para tener un entendimiento genético de la evolución morfológica. A continuación, revisaremos diferentes evidencias para la divergencia morfológica.

- 1) Pleiotropía en mosaico: muchas de las proteínas que actúan durante el desarrollo participan en varios procesos independientes y la formación de patrones dispares de estructuras corporales.
- 2) Complejidad genética ancestral: taxa de animales morfológicamente dispares y separados que desde hace mucho tiempo comparten conjuntos de genes similares para la formación del cuerpo y para los patrones del mismo.
- 3) Equivalencia funcional de ortólogos distantes y parálogos: muchas de las proteínas de los animales exhiben actividades funcionales equivalentes *in vivo* cuando son sustituidas por otras.
- 4) Homología profunda: la formación y diferenciación de numerosas estructuras morfológicamente divergentes entre phyla (como ojos) están gobernados por un grupo de genes similares y algunos conservan circuitos genéticos regulatorios altamente conservados.

- 5) Duplicación genética no frecuente: la duplicación genética no es necesariamente un ingrediente para generar novedad morfológica. Existe evidencia de que la duplicación de algunos genes es eliminada por sus efectos en procesos del desarrollo.
- 6) Heterotropía: cambios en la regulación espacial de la maquinaria de genes y los genes que éstos regulan, están asociados con divergencia morfológica.
- 7) Modulación de elementos regulatorios *cis*: regiones regulatorias *cis* largas, complejas son características distintivas de loci pleiotrópicos.
- 8) Redes regulatorias vastas: proteínas regulatorias individuales controlan cientos de genes blanco de elementos regulatorios *cis*.

1.2.1 Genes

Los biólogos han reconocido por ya mucho tiempo que para entender el proceso de la evolución necesitamos entender el papel de los genes en el desarrollo (Carroll, S. 2008). La regulación genética en evo-devo es la contribución más famosa y aceptada de la teoría evolutiva (Hoekstra, H. y Coyne, J. 2007). Los biólogos han buscado entender qué genes y qué tipo de cambios en sus secuencias son responsables para la evolución de diversidad morfológica (Carroll, S. 2008).

Dado que los genes son objeto de estudio en la biología del desarrollo, es necesario definirlos. Un gen es una región localizable de secuencia genómica que corresponde a una unidad de herencia; está asociada con regiones regulatorias, regiones de transcripción y otras secuencias funcionales. (Pearson, H. 2006)

El conjunto de genes de cualquier organismo está dividido en dos partes funcionales: los *genes estructurales* o *housekeeping*⁴ y los *genes regulatorios* (Ridley, M. 2004). Los *genes estructurales* o *housekeeping*, son aquellos que se relacionan con rutas metabólicas y mantenimiento celular ya que codifican para enzimas, proteínas estructurales, de transporte y defensivas. Por su parte, los *genes regulatorios* codifican para moléculas

⁴ Los genes *housekeeping* son constitutivos, es decir que todas las líneas celulares en un organismo pluricelular los presentan. Su nivel de expresión es el que cambia entre tipos celulares. Por ejemplo, los seres humanos cuentan con 22 mil genes en cada una de las 250 líneas celulares. Cada una de ellas expresa alrededor de 15 mil genes; el número restante corresponde a genes de expresión tejido-específico.

que regulan la expresión de otros genes, éstos sean estructurales o regulatorios. Es de resaltar que la distinción que hacen los biólogos entre estos dos grupos es imperfecta.

Ahora bien, para los genes que regulan el desarrollo, también se ha recurrido a separarlos en dos grupos: genes que codifican para factores de transcripción y genes que codifican para proteínas de señalización (Ridley, M. 2004).

Britten y Davidson (Ridley, M. 2004) sugirieron que la reorganización dentro de las redes de genes regulatorios puede causar cambios evolutivos importantes; el cambio evolutivo en la morfología animal, por ejemplo, resulta de la alteración de la organización funcional de las redes genéticas regulatorias que controlan el desarrollo del plan corporal (Peter, I. y Davidson, E., 2011). Una vez propuesto esto, en 1975 King y Wilson (Ridley, M. 2004) partieron de esta idea y la aplicaron en la evolución humana: al comparar los genomas de chimpancés y humanos observaron que son prácticamente idénticos pues sólo el 1.5% de nucleótidos cambian entre estas dos especies. Sin embargo, fenotípicamente somos muy diferentes.

Sucede que, en la evolución humana, un cambio fenotípico muy grande parece ser producido por un cambio genético muy pequeño. Lo que King y Wilson hipotetizaron fue que estos cambios se dieron en genes regulatorios. A pesar de que se necesita la secuenciación de muchos genomas de simios, la hipótesis de estos científicos es una idea popular a cerca de la evolución de los humanos. Por su parte, Britten y Davidson en 1969 y 1971 (Hoekstra, H. y Coyne, J. 2007), sugirieron que la evolución morfológica resulta por cambios en genes *integradores* (factores de transcripción) y *receptores* (promotores) y no tanto por los genes *productores* (genes estructurales).

Todo esto surgió debido a que durante el último cuarto de siglo, los biólogos moleculares comenzaron a reconstruir la historia de la vida al comparar las secuencias de genes entre diferentes organismos. El descubrimiento de redes genéticas conservadas que controlan el desarrollo embrionario ha revolucionado la teoría evolutiva de Darwin (De Robertis, E.M. 2008).

Un problema central es explicar cómo es que las redes genéticas conservadas presentes en el ancestro de los animales -urbilateria- se modificó para generar la gran diversidad de la vida animal de la Tierra. Se ha visto que una manera eficiente de adaptación a nuevos ambientes consiste en la pérdida de genes, por lo que es posible que la

pérdida de éstos durante periodos de selección natural intensa pudo haber jugado un papel importante en el origen de los phyla (De Robertis, E. M. 2008).

1.2.1.1 Homeóticos

El mejor ejemplo sobre genes del desarrollo asociado a cambios evolutivos son los genes *Homeóticos*.

De estos genes se sabe cuáles y cuántos están presentes en ciertos taxones, lo que facilita saber cuándo, en la historia evolutiva del animal, los genes *Homeóticos* cambiaron. El complejo homeótico se expandió en dos puntos de la filogenia animal; uno se encuentra cerca del origen de los bilaterales tripoblásticos. En cnidaria, que tiene simetría radial y dos capas celulares, sólo se han encontrado dos genes *homeóticos* a comparación de un grupo de al menos siete en el grupo *bilateria*.

La segunda expansión ocurrió cerca del origen de los vertebrados. Los invertebrados tienen un único grupo de 13 genes *hox*, el cual comparten con el grupo más cercano de vertebrados, los Anfioxos. En cambio, los vertebrados presentan cuatro copias de este grupo de 13 genes *Homeóticos* debido a que todo el genoma se ha duplicado dos veces (De Robertis, E. M. 2008).

La intrincada maquinaria dedicada a especificar la identidad a lo largo del eje antero-posterior pudo no haber evolucionado de la misma manera dos veces, por lo que la conclusión es que Urbilateria ya tenía por lo menos un complejo homeótico funcional. Los complejos homeóticos han sido secuenciados en múltiples phyla y se puede deducir que el ancestro de urbilateria tenía un complejo de al menos siete genes (De Robertis, E. M. 2008).

Este grupo de genes no fue el único que se duplicó con la aparición de los vertebrados, sino que otros grupos que operan durante el desarrollo también sufrieron este cambio; es probable que las duplicaciones del genoma hayan sido un componente primordial en el éxito evolutivo de los vertebrados (Goodman, C. y Coughlin, B. 2000. p. 582; De Robertis, E. M. 2008).

Cuando se habla de complejidad en vertebrados se hace referencia a que tiene un mayor número de tipos celulares; la complejidad anatómica está íntimamente relacionada con el número de genes *Homeóticos* que presenta cada especie animal. Por esta razón, se

dice que este grupo de genes hace a los organismos *evolucionables* ya que, en caso de duplicar el número, su complejidad aumentará. Los mamíferos, por ejemplo, tienen cuatro complejos homeóticos con 13 genes parálogos de cerca de 100 kilobases; los ratones y humanos presentamos un total de 39 genes homeóticos dado que algunos duplicados se perdieron.

Edward B. Lewis (1918-2004) descubrió que los genes que controlan la identidad de los segmentos abdominales de la mosca están agrupados en el genoma y ocupan el mismo orden a lo largo del DNA que la manera en que se expresan a lo largo del eje antero-posterior, a lo que llamó *colinearidad*. Con esto, hipotetizó que los nuevos genes surgieron de duplicaciones y se agregaron de manera secuencial para reprimir los segmentos más anteriores (De Robertis, E. M. 2008). Cuando Matthew Scott y Walter Gehring buscaron los genes regulatorios duplicados encontraron que, en realidad, hay una región pequeña conservada de 180 nucleótidos que llamaron *homeobox*, la cual codifica para un dominio de 60 aminoácidos llamado *homeodominio*, el cual se volvió la piedra angular de los biólogos del desarrollo. A partir de esto, se descubrieron estas regiones en muchos animales, incluido el humano.

1.2.2 Regulación

Hace más de 30 años, Antonio García-Bellido (1936-?) propuso la existencia de tres grupos de genes: *activadores*, *selectores* y *realizadores*, los cuales son necesarios para la diferenciación celular durante el desarrollo ya que dan un esquema funcional para el control de los procesos morfogenéticos (Hueber, S. *et al.*, 2007). Su propuesta consiste en que, una vez activados en el territorio apropiado por los *genes activadores*, los *genes selectores* (homeóticos) no especifican directamente diferencias morfológicas entre diversos segmentos, sino que seleccionan un grupo de genes subordinados río abajo. Los *genes realizadores* codifican para proteínas necesarias para la diferenciación celular.

La progresión del desarrollo está dirigida por dominios espacio temporales durante la expresión genética (Spitz, F. y Furlong, E. 2012). A partir de los estudios de las diferentes clasificaciones de genes y de dominios reguladores, se ha visto que la expresión de un gen es consecuencia de un fino balance entre dos componentes: el primero es la expresión de los factores *trans-acting*, los cuales son factores de transcripción y proteínas

regulatorias, quienes tienen afinidad específica entre cada una y para secuencias blanco de DNA; el segundo es el blanco de estos factores o la región regulatoria *cis* del DNA, la cual responde a los factores *trans-acting* al permitir o reprimir la expresión genética (Guruharsha, K. y Vijayraghavan, K., 2004).

Existen regiones regulatorias distribuidas en el genoma, los cuales reciben el nombre de *enhancers*, que son secuencias de DNA que contienen elementos regulatorios *cis*. Los estudios con elementos regulatorios han revelado cómo es que las redes regulatorias y sus efectores aseguran que un gen se prenda en el momento adecuado, en el lugar adecuado y, más importante, en los niveles adecuados (Guruharsha, K. y Vijayraghavan, K., 2004).

Los científicos han especulado que las similitudes entre diferentes especies están dadas por la función de las secuencias regulatorias, las cuales determinan el tiempo y el patrón de la expresión genética. Estos patrones de expresión genética definen una diversidad de funciones celulares durante el desarrollo, la cual permite también a través de la regulación de expresión genética y por mecanismos epigenéticos, un refinamiento futuro de rutas de desarrollo en cada organismo (Guruharsha, K. y Vijayraghavan, K., 2004).

1.2.2.1 Regiones regulatorias *cis*

En tanto que evo-devo maduraba, los científicos se centraban en la regulación genética que involucraba a los elementos regulatorios *cis*. Actualmente, estos elementos son vistos no sólo como el blanco más probable para la evolución de la regulación genética sino también como el sitio más importante de cambio evolutivo, al menos para lo que se refiere a morfología (Peter, I. y Davidson, E., 2011).

Los elementos regulatorios *cis* (*cis*-regulatory element, CRE) consisten en algunos cientos de pares de bases de DNA de secuencias no codificantes 5' del gen que controlan; contienen sitios para factores de transcripción y/u otras moléculas regulatorias necesarias para activar y mantener la transcripción. Sin embargo, son más largas y complejas que las que codifican para proteínas relacionadas con la especificidad celular involucradas en procesos fisiológicos.

Los CREs regulan la expresión genética, la fisiología y el desarrollo a través de la acción integrada de diferentes elementos regulatorios *cis* que incluyen promotores núcleo,

elementos proximales al promotor, así como módulos regulatorios *cis* que se encuentran a grandes distancias de los sitios de inicio de la transcripción (Transcription start sites, TSSs) como son enhancers, silenciadores, insulators y elementos tethering (Sptiz, F. y Furlong, E. 2012).

Las secuencias regulatorias *cis* determinan de manera combinatoria qué entrada (input) afectarán la expresión de cada gen y qué otros genes afectará; esto es, ellos implementan los vínculos funcionales entre los genes regulatorios, formando redes de subcircuitos (Peter, I. y Davidson, E., 2011). Los arreglos de los CREs, que de manera independiente gobiernan la expresión de kits de genes a diferente tiempo y espacio durante el desarrollo, presentan una nueva imagen para la organización genética con tres implicaciones importantes para la evolución de la forma:

1) múltiples CREs son evidencia de cómo la función genética se ha expandido y diversificado sin duplicación de secuencias codificantes.

2) las mutaciones en CREs no afectan la función de otros CREs o de la proteína, es decir, no tienen efectos pleiotrópicos.

3) las mutaciones en regiones codificantes pueden afectar todas las funciones de las proteínas, es decir, presentar el mayor efecto pleiotrópico.

La expresión genética está controlada por factores regulatorios *cis* y *trans*⁵ y en caso de que ocurra alguna mutación en cualquiera de los dos, ésta se altera. Las secuencias *cis* tienen sitios de unión que interactúan con las proteínas o los RNAs *trans*. Entre especies, la divergencia de *cis* cuenta en gran proporción de divergencia en la expresión comparada con la que ocurre dentro de las especies. El silenciamiento de genes somáticos es atribuible a un ambiente celular *trans* (un ambiente celular no permite la expresión genética debido a la falta de activadores transcripcionales o la presencia de represores) o a un contexto cromatínico *cis* (por mecanismos que mantienen a los genes silenciados haya o no activadores transcripcionales) (Foshay, K. *et al.* 2012).

Un principio importante de la biología evolutiva del desarrollo es que las mutaciones adaptativas que afectan la morfología, son más propensas a ocurrir en las

⁵ Las secuencias regulatorias *trans* son aquellas que codifican la transcripción de factores que se unen a las secuencias regulatorias *cis*. Son proteínas, RNAs u otra molécula difundible que afecte la expresión genética.

regiones regulatorias *cis* que en las regiones del genoma que codifican para proteínas (Hoekstra, H y Coyne, J. 2007). Esto se debe a dos causas:

1) la naturaleza modular de los elementos regulatorios *cis* los libera de efectos pleiotrópicos deletéreos.

2) existen evidencias que soportan el papel del cambio en los genes regulatorios en la adaptación, especialmente adaptación morfológica.

Dado que el desarrollo está controlado por redes genéticas regulatorias, la evolución del desarrollo y la forma se da debido a cambios dentro de éstas. Por tanto, una pregunta central en la teoría evolutiva del desarrollo consiste en descifrar cómo es que las redes genéticas y sus componentes evolucionan. Se sabe que este proceso no está ligado con las duplicaciones genéticas ni con la evolución de las proteínas, pero sí se relaciona con cambios espaciales en la expresión génica y se infiere que evoluciona por la transformación de los CREs.

A partir de esto es que nace la hipótesis de la regulación *cis*. Esto es que las mutaciones en los CREs de genes existentes está propuesto como una manera común y fuente continua de variación morfológica comparada con la evolución de nuevos genes (Carroll, S. 2008).

Las mutaciones que afectan la función de estas secuencias contribuye a la diversidad fenotípica dentro y entre especies (Wittkopp, P. y Kalay, G. 2011). Aunque hoy se sabe que el cambio morfológico, la evolución de las redes genéticas regulatorias, la adaptación y la especiación, han involucrado otros mecanismos además de la evolución de los CREs (Hoekstra, H y Coyne, J. 2007).

Sin embargo, cuando se pone en perspectiva los cambios funcionales en los factores de transcripción, veremos que una gran cantidad de CREs han evolucionado a causa de la transformación de redes genéticas regulatorias (Carroll, S. 2008) pues las mutaciones que afectan la actividad de estas secuencias son la causa más prevalente de divergencia morfológica (Wittkopp, P. y Kalay, G. 2011).

Carroll considera que la evolución de la morfología animal, además de otras características macroevolutivas, resultó por cambios en los elementos regulatorios *cis* (Hoekstra, H. y Coyne, J. 2007).

Sin embargo, los estudios genómicos dan poco apoyo a la teoría regulatoria *cis* ya que muchos de ellos han detectado adaptación en regiones genómicas que codifican para proteínas, incluyendo factores de transcripción, mientras que muy pocos han examinado regiones regulatorias (Hoekstra, H y Coyne, J. 2007).

Los cambios en la función de la proteína son responsables de la divergencia fenotípica pero muchas proteínas homólogas tienen funciones altamente conservadas entre especies, aunque exhiben diferencias en su expresión que contribuye a la divergencia fenotípica. La omnipresencia de evolución regulatoria está frecuentemente racionalizada por el hecho de que se espera que cambios en las regiones que codifican para proteínas sean más pleiotrópicos, es decir, afecten a más fenotipos más que cambios en los CREs. Esto es porque cambios en la secuencia y función de una proteína debe afectar a todas las células en donde la proteína está activa, mientras que el cambio de un CRE debe sólo tener impacto en las células que son afectadas por el cambio de expresión específica de los genes.

Agrupaciones de factores de transcripción y de RNA's no codificantes como los miRNAs que se expresan combinatoriamente, delimitan a los tipos celulares. Al unirse a elementos regulatorios *cis*, los factores de transcripción y los miRNAs pueden controlar docenas, si no es que cientos, de genes blanco. Sin embargo, mientras los TFs regulan la transcripción negativa o positivamente, los miRNAs regulan la expresión genética a través de la represión (Hobert, O. 2008).

El silenciamiento *cis* es necesario para mantener la identidad celular y su pérdida puede llevar a una expresión aberrante de genes reguladores maestros de destinos celulares (Foshay, K. *et al.* 2012).

1.2.2.2 Enhancers y promotores

Los cambios en la expresión de los genes del desarrollo están asociados con ganancias, pérdidas o cambios en elementos regulatorios de éstos. Uno de los elementos más estudiados es el *enhancer*, que junto con factores de transcripción asociados a ellos, tienen un papel protagónico en la iniciación de la expresión genética (Spitz, F. y Furlong,

E. 2012). Como hemos visto, para Ridley (2004), los switches genéticos permiten que exista innovación en la evolución, haciendo que los organismos sean *evolucionables*⁶.

Los enhancers son definidos como un elemento regulatorio *cis* del DNA, que estimula la transcripción y expresión genética durante el desarrollo, independientemente de su posición y orientación con respecto al sitio de inicio transcripcional, como resultado de la unión de proteínas que son factores de transcripción (Borok, M. *et al.*, 2010). La descripción original de los enhancers enfatizaba su papel de activación, sin embargo, muchos de ellos están relacionados con interacciones transcripcionales de activación y represión sin silenciadores (Arnosti, D. y Kulkarni, M., 2005). Los enhancers no evolucionaron con alguna finalidad pero es cierto que su papel en las especies ha hecho que la biodiversidad sea una consecuencia (Goodman, C. y Coughlin, B. 2000. p. 587).

Los enhancers son pequeñas secuencias de DNA de algunos cientos de pares de bases que se localizan río arriba (5'), río abajo (3') con relación al promotor, en intrones o muy alejados de los genes que controlan. La localización genómica de enhancers de diferentes especies que tienen expresión análoga en el mismo tejido están comúnmente conservados entre especies. Estas secuencias, con la capacidad de funcionar en una manera autónoma o modular, sirven como plataformas operacionales para reclutar factores de transcripción que regulan a este fenómeno (Spitz, F. y Furlong, E. 2012).

Las proteínas con homeodominios pueden actuar como activadores o como represores de la transcripción, dependiendo de otros factores de transcripción que se unan al mismo complejo de enhancer. Las proteínas que se unen a enhancers son determinadas por la secuencia del DNA del enhancer a la cual se unen. Al mutar las secuencias de DNA, se pueden generar nuevos enhancers que regulan la transcripción de genes que determinan diferentes resultados morfológicos, dando una fuente principal de variación durante la evolución (De Robertis, E. M. 2008).

La manera en que los enhancers dan lugar a patrones complejos de actividad temporal y espacial y cómo los factores de transcripción interpretan al genoma en las secuencias correctas en el momento adecuado del desarrollo, ha sido sujeto de diferentes investigaciones desde su descubrimiento hace unos 30 años (Spitz, F. y Furlong, E. 2012).

⁶ Cuando el autor habla de que los organismos son *evolucionables* por cambios moleculares, se refiere a la probabilidad de evolucionar en algo nuevo. (Goodman, C. y Coughlin, B. 2000. p. 587)

A diferencia de los promotores, los enhancers tienden a ser más variables entre especies. En metazoos que tienen diferentes tipos celulares, la expresión genética es regulada por múltiples enhancers, cada uno controlando la expresión en un rango limitado de tipos tisulares durante un momento particular del desarrollo.

De manera convencional, se cree que cada enhancer controla un subconjunto único de genes. Si dos enhancers trabajan de manera conjunta y se superponen contribuyen con estabilidad fenotípica, mientras que la independencia funcional entre ellos permite que los efectos de la mutación en un enhancer tengan efectos limitados en la expresión genética de genes controlados por otros enhancers (Wittkopp, P. y Kalay, G. 2011).

Mientras los enhancers son percibidos como los CREs protagonistas para la divergencia regulatoria *cis*, los **promotores** no son los operadores principales del mismo fenómeno (Wittkopp, P. y Kalay, G. 2011).

Para entender lo que es un promotor, se debe comprender la regulación genética, la cual es el proceso en el cual una célula controla la activación de un grupo de genes. Dicha regulación puede ocurrir a diferentes momentos a lo largo del proceso de expresión genética, principalmente a nivel transcripcional. Las proteínas que median la regulación transcripcional se conocen como *factores de transcripción (TFs)*. Los TFs se unen a secuencias cortas específicas de DNA que reciben el nombre de *sitios de unión (BSs)* o *sitios de unión de factores de transcripción (TFBSs)*, las cuales son, en su mayoría, de 5 a 20 pares de bases de largo (CTCF es de 60 a 80 pares de bases). Éstas se localizan en las regiones río arriba del gen regulado, llamados *promotores*. La longitud del promotor puede variar de 100 a 1000 pares de bases aunque no existe una longitud establecida que defina a un promotor. Cada uno contiene una combinación única de secuencia de DNA (elementos regulatorios *cis*) que, juntos, son responsables del reclutamiento de complejos proteínicos que activan o silencian la expresión de genes (Gulick, J. y Robbins, J. 2009).

La mayoría de los genes eucariotes contienen un promotor localizado cerca del sitio de inicio de la transcripción, aunque algunos genomas contienen promotores alternativos que activan la transcripción en diferentes lugares del genoma. Los promotores son necesarios para la transcripción en eucariotes pero solos, producen niveles basales de RNAm. Es por esto que se unen a un núcleo de reguladores transcripcionales.

Los cambios evolutivos en las redes regulatorias de genes son responsables de evolución morfológica. Un ejemplo de esto es el gen *HOXC6*, responsable del número y la forma de vertebras del ratón y demás vertebrados. Existen gradientes químicos asociados al enhancer de este gen, los cuales pueden prenderlo o apagarlo dependiendo de las concentraciones en las que éste se encuentre. El cambio morfológico se puede dar si el enhancer del *HOXC6* cambia, es decir, si se prende o apaga dependiendo las concentraciones relacionadas con la parte anterior o posterior del cuerpo. Lo importante de este ejemplo no es el cambio que ocurre en el enhancer o las moléculas que interactúan con éste, sino que la morfología se altera si se agregan o eliminan switches que controlan los genes ya existentes. Si un gen causa que una pata se desarrolle, éstas pueden ser eliminadas o agregadas dependiendo de que el gen se prenda o apague. Es decir que la importancia de los enhancers radica en que, cuando se les agrega a un gen y que permite que éste se encienda en una circunstancia nueva, esto le da una nueva función sin comprometer la ya existente.

Otros elementos que pueden ser encontrados en los promotores, además de los enhancers, son los *insulators*, que confieren inmunidad de los efectos del silenciamiento o enhacer del contexto cromosómico en el cual los genes y transgenes se insertan, y los represores. Es raro que todos estos elementos se definan completamente para solo un promotor (Gulick, J. y Robbins, J. 2009).

1.2.2.3 Factores de transcripción

Las proteínas que median la regulación transcripcional son llamados *factores de transcripción (TFs)*. Los factores de transcripción son moléculas que se unen a *enhancers* que contienen zonas de sitios de unión para éstos (Spitz, F. y Furlong, E. 2012). Por su parte, las proteínas de señalización funcionan en las redes de control celular que prenden y/o apagan genes específicos. Las interacciones entre los TFs y sus sitios de unión en el DNA son una parte integral de las redes regulatorias genéticas que controlan el desarrollo, procesos centrales celulares y respuesta a perturbaciones ambientales (Badis, G. *et al.* 2009). Ejemplo de esto son los genes *homeóticos*, los cuales codifican para factores de transcripción; *hedgehog*, *notch* y *wingless*, codifican para proteínas de señalización.

Muchos factores de transcripción también son proteínas de señalización, lo que hace que no exista una división clara entre los dos grupos.

Cada factor de transcripción regula múltiples genes y puede funcionar como activador, es decir, aumentar el nivel de transcripción de un gen regulado, o funcionar como represor, o sea, disminuir el nivel de transcripción. Los factores se unen a los *enhancers* de una manera combinatoria, que es facilitada a través de mecanismos cooperativos directos o indirectos. Esta naturaleza combinatoria de la manera como se ocupan los *enhancers*, permite a los genes ser regulados en patrones complejos en tiempo y espacio (Spitz, F. y Furlong, E. 2012).

Existen dos modelos de activación:

- Después de unirse al promotor, el factor de transcripción interactúa con componentes de la RNA polimerasa. Esta interacción atrae a la RNA polimerasa en los alrededores del promotor del gen, facilitando su unión con el núcleo del promotor.
- Cuando el factor de transcripción se une al DNA, la estructura de la cromatina en la región del promotor cambia y el área de unión de la RNA polimerasa se vuelve más accesible.

Existen también, dos modos de represión:

- El represor compite con el factor de transcripción activador en su sitio de unión. Por tanto, disminuye los efectos del activador, dejando una unión menos eficiente de la RNA polimerasa al promotor. Esto resulta en una disminución de los niveles de expresión del gen.
- El represor interactúa con los mismos componentes de la RNA polimerasa que el activador. Con esto, el represor previene que el activador interactúe con la RNA polimerasa y promueva la transcripción.

Es importante diferenciar que, mientras cualquier factor de transcripción se puede unir a múltiples sitios en el genoma, la actividad de los elementos regulatorios *cis* en los *enhancers*, necesita de la acción concertada de muchos eventos de unión (Spitz, F. y Furlong, E. 2012).

Los factores de transcripción juegan papeles importantes en procesos celulares pues frecuentemente regulan otros reguladores asociados con dichos procesos (Boyer, L., *et al.*

2005); aseguran la expresión correcta de genes específicos, y con esto controla muchos procesos biológicos que van desde la progresión del ciclo celular y el mantenimiento del balance metabólico y fisiológico hasta la diferenciación celular y el tiempo de desarrollo. Al ser componentes celulares esenciales que controlan la expresión genética, su actividad determina la manera en que funcionan las células y responden al ambiente. Sin embargo, poco se sabe de estos factores como cuántos contiene el genoma humano, cómo se expresa en diferentes tejidos y si están evolutivamente conservados (Vaquerizas, J. *et al.* 2009). De hecho, sólo unas cuantas secuencias específicas de factores de transcripción han sido caracterizadas para identificar todas las secuencias a las que se pueden, o no, unir (Badis, G. *et al.* 2009).

Los TFs están presentes en los oncogenes y en un porcentaje de los desordenes del desarrollo humano. Además, las alteraciones en la actividad y especificidad regulatoria de los factores de transcripción es una fuente de diversidad fenotípica y evolución adaptativa. Se cree que el aumento de la sofisticación del sistema regulatorio transcripcional parece ser un requerimiento para el surgimiento de la vida animal.

Diferentes arreglos de proteínas, como son factores de transcripción generales, cofactores histonas y proteínas de remodelación de la cromatina, son cruciales para el éxito de la transcripción en células eucariontes (Vaquerizas, J. *et al.* 2009).

Se ha examinado la relación entre la edad de un gen y su función biológica. Aquellos que son más antiguos y conservados forman parte de funciones celulares básicas, mientras que los más nuevos y menos conservados están asociados con tareas especializadas. Por tal motivo, los genes más antiguos se deben expresar ampliamente en tanto que son más requeridos en el organismo. Es así como se sabe que los TFs que controlan el desarrollo tienden a estar más conservados que otro tipo de reguladores (Vaquerizas, J. *et al.* 2009).

La falla en la regulación de los TFs está asociada con varias enfermedades, como el cáncer y síndromes del desarrollo. Sin embargo, no es posible determinar si los cambios en la expresión de los factores de transcripción es directamente responsable para determinada enfermedad o es un efecto indirecto de otros defectos (Vaquerizas, J. *et al.* 2009).

Se ha visto que de los genes humanos que tienen una cantidad importante de expresión, existe un número muy elevado de factores de transcripción comparado con

análisis en chimpancés. Sin embargo, muchos cambios en la regulación genética debe ser deletérea y aumenta la susceptibilidad de enfermedades. La sobre representación de factores de transcripción entre los genes con niveles modificados de expresión en el linaje humano es consistente con la sugerencia de que muchas diferencias entre humanos y chimpancés se deben a cambios en la regulación genética (Gilad, Y. *et al.* 2006).

1.2.3 Mecanismos evolutivos del desarrollo

Desde los últimos años, la ciencia se ha valido de todas las herramientas de la biología molecular, genética molecular, biología del desarrollo, filogenética y paleontología en la investigación de mecanismos evolutivos del desarrollo (Tabla 1), debido a que éstos mecanismos no se valen únicamente de la genética, sino que emergen como producto del desarrollo (Hall, B. 2003. p. 493).

La heterocronía es un mecanismo evolutivo del desarrollo, es decir, un mecanismo que opera durante el desarrollo embrionario pero que puede ser modificado a lo largo del curso de la evolución y, por tal motivo, lleva a cabo el cambio evolutivo en el fenotipo (Hall, B. 2003).

Otro mecanismo evolutivo de desarrollo es la heterotropía, la cual es una alteración en la localización espacial de uno o más procesos de desarrollo. Un ejemplo de heterotropía es el origen de células germinales del endodermo o del mesodermo en diferentes grupos animales. Tanto la heterocronía como la heterotropía, son conceptos acuñados por Ernst Haeckel. (Hall, B. 2003)

La heterocronía ha sido controvertida desde hace más de 150 años pues, ciertamente, no es el único mecanismo evolutivo del desarrollo.

Nivel	Mecanismos
Gen	Regulación, red, interacción, tamaño del genoma, procesos epigenéticos (metilación, impronta, inactivación cromosómica)
Célula	División, migración, condensación, diferenciación, interacción, patrones,

	morfogénesis, inducción embrionaria.
Tejidos, órganos	Modularidad, segmentación, inducción embrionaria, interacción epitelial-mesénquima, crecimiento.
Organismo	Re patterning ontogenético, asimilación genética, plasticidad fenotípica, polimorfismo, morfología funcional.

Tabla 1. Ejemplo de mecanismos evolutivos del desarrollo a diferentes niveles de herencia biológica. La heterocronía y heterotropía están en todos los niveles. (Tomada de Hall, B. 2003. p. 492)

Actualmente, sabemos que existen más mecanismos evolutivos del desarrollo, además de la heterocronía y heterotropía debido a que evo-devo involucra más que cambios en el tiempo de desarrollo. Esto se sabe en parte por nuestro aumento en el entendimiento del desarrollo, pero sobre todo, porque se conocen nuevos mecanismos que emergen como productos de éste (Tabla 2). Con estos productos, las redes y cascadas genéticas (módulos genéticos) relacionan al genotipo con las unidades morfogenéticas (módulos celulares, capas germinales, campos embrionarios o condensaciones celulares) mientras que los productos epigenéticos como la inducción embrionaria, interacción de tejidos e integración funcional, relacionan unidades morfogenéticas con el fenotipo (Hall, B. 2003. p. 494).

Unidades o productos	Base de mecanismos de evo-devo
Genotipo	Genes
Módulos genéticos	Redes genéticas; cascadas genéticas
Unidades morfogenéticas	Condensación celular
Procesos epigenéticos	Inducción embrionaria, interacción tisular, integración funcional.
Fenotipo	Interacciones intra e interindividuo/especies y ecológicas/ambientales

Tabla 2. Tabla que muestra las unidades emergentes y los procesos entre el genotipo y el fenotipo y la base para los mecanismos evolutivos del desarrollo operando entre ellos. (Tomada de Hall, B. 2003. p. 494)

Hall (Hall, B. 2003) menciona que en 1990, se identificaron cuatro elementos básicos en el entonces nuevo campo de evo-devo: heterocronía, limitaciones del desarrollo, sistemática y homología. Por su parte, diez años después, Hall identificó cinco elementos:

- 1) el origen y evolución de desarrollo embrionario
- 2) cómo las modificaciones del desarrollo y procesos del desarrollo llevan a la generación de nuevas características
- 3) la plasticidad adaptativa del desarrollo en la historia de vida de la evolución
- 4) cómo la ecología impacta en el desarrollo para modular el cambio evolutivo
- 5) las bases del desarrollo de homoplasia y homología.

Los mecanismos evolutivos del desarrollo nos permiten entender cómo es que la forma se mantiene o se transforma durante la evolución, y si es que la transformación es una modificación menor en la forma o da lugar a una característica novedosa (Hall, B. 2003. p. 492).

Los mecanismos del desarrollo pueden ser observados entre taxones cuando la estructura normal está incompleta – como en rudimentos o vestigios- o aparece sólo en algunos individuos – atavismo-. En esto caso, ambos disocian homología de un proceso de homología de la estructura. De la misma manera, diferentes mecanismos de desarrollo pueden producir características similares – homología – (Hall, B. 2003. p. 493).

Además, evo-devo nos permite entender la continuidad en la relación de conceptos aparentemente aislados como son homología, homoplasia, paralelismo, convergencia, rudimentos, regresiones y atavismos. Hall resalta que los mecanismos evolutivos del desarrollo nos permiten por vez primera entender el verdadero significado del concepto de modificación en la “descendencia con modificación”, estasis en “estasis morfológica”, y restricción en “restricción filogenética o del desarrollo”.

Los mecanismos evolutivos del desarrollo incluyen interacciones entre individuos de la misma especie, individuos de diferentes especies y especies con su respectivo ambiente biótico y abiótico. Éstas últimas relacionan las comunidades ecológicas.

1.2.4 Evidencias

A continuación se presentan ejemplos que reúnen a las evidencias antes mencionadas:

1.2.4.1 Deuterostomados y Protostomados

Taxonómicamente, los animales bilaterales tripoblásticos son divididos en dos grandes grupos a partir de la manera en que se desarrollan: protostomados y deuterostomados. Los protostomados tienen un clivaje o segmentación del cigoto en espiral mientras que los deuterostomados presentan un patrón radial. Otra característica para dividirlos en estos dos taxones es el desarrollo de la estructura embrionaria llamada blastoporo: en los protostomados, el blastoporo da lugar a la boca mientras que en los deuterostomados éste da lugar al ano (Ridley, M. 2004). Además, los protostomados tienen el cordón nervioso de manera ventral y el ganglio cerebral de manera dorsal, mientras que los deuterostomados presentan el sistema nervioso central de manera dorsal.

Podría esto ser suficiente para creer que los genes de un grupo son diferentes a los del otro dado que la misma estructura, el blastoporo, resulta en dos sumamente distintos. Sin embargo, se ha demostrado que el mismo grupo de genes opera en ambos taxones. Los genes que regulan esto, presumiblemente evolucionaron cuando los animales se originaron y han sido conservados desde entonces. Si un gen es encontrado en cualquier cordado y además en ecdisozoa o lofotrocozoa, la conclusión es que este gen estuvo presente en el ancestro urbilateria. De manera similar, si un gen se encuentra en cnidaria y en cordado, también debió estar presente en el ancestro urbilateria.

El último ancestro común que compartieron todos los animales simétricos bilaterales llamados Urbilateria, debió haber sido una criatura compleja que tenía la mayoría de las redes genéticas de desarrollo con las cuales los animales son formados (De Robertis, E. M. 2008). La mayoría de los animales evolucionaron de un ancestro común, Urbilateria, pero se ha encontrado por la comparación de genomas que muchos de los genes presentes en el ancestro urbilateria, se han perdido por evolución individual de los phyla a lo largo del tiempo (De Robertis, E. M. 2008).

De manera sorprendente, todos los planes corporales característicos de los 35 phyla que existen hoy en día ya estaban presentes hace 525 millones de años; mientras las especies prosperaron y desarrollaron numerosas variaciones, pero los planes corporales se

mantuvieron. Por tal motivo, la pregunta que surge al conocer la explosión Cámbrica es por qué no aparecieron nuevos phyla durante este largo periodo de tiempo evolutivo (De Robertis, E. M. 2008).

1.2.4.2 Homología

Darwin tenía claro que las similitudes embrionarias son un buen argumento a favor de la conexión genética entre grupos animales, debido a que Johannes Müller (1801- 1858) lo influenció con la recopilación que hizo en 1842 sobre las leyes de von Baer. Mientras que von Baer nunca aceptó las homologías entre phyla, la biología evolutiva hizo posible buscar conexiones entre tipos a partir de la idea de que el reino animal tiene un origen monofilético (Gilbert, S. 2003 p. 468). Darwin puso manos a la obra y observó estadios embrionarios y larvarios en busca de homologías que pudieran estar *oscurecidas* en los adultos. En *El origen de las especies*, Darwin reconoce que la larva del percebe es como un camarón. Con esto, los dos grandes dominios del reino animal, es decir, vertebrados e invertebrados, se unieron por las homologías de sus larvas (Gilbert, S. 2003 p. 468).

Los fundamentos de la embriología evolutiva fueron construidos por científicos que vieron a la evolución como el principio para delinear una clasificación natural en la clasificación del mundo natural. Las homologías son críticas para esto y hay tres principios que forman las bases para la embriología evolutiva (Gilbert, S. 2003 p. 468). Primero, todos los animales se derivan de las mismas tres capas germinales, pues por ejemplo, tanto los músculos de los insectos como lo de vertebrados se originan del mesodermo. En segundo lugar, los estadios del desarrollo están conservados pues cada organismo pasa por clivaje, gastrulación y organogénesis. Finalmente, el tercero, las homologías que existen en las capas germinales de larvas y embriones.

Gracias a la genética del desarrollo moderna se han hecho descubrimientos que han modificado y clarificado el significado de homología. Ejemplo de esto, los ojos.

Los ojos de insectos y vertebrados fueron considerados un excelente ejemplo de analogía dado que realizan la misma función –ver- pero están conformados por estructuras diferentes, lo que sugería que habían evolucionado de manera independiente a partir de un ancestro que no tenía ojos. No fue sino hasta la década de los 90's, cuando el investigador

Walter Gehring (1939-) comenzó a estudiar los genes necesarios para el desarrollo del ojo en la mosca de la fruta y ratones.

El gen *ey*, era conocido en la mosca de la fruta mientras que el gen *Pax6* hacía lo propio en el ratón. Cuando secuenció ambos genes, resultó que eran similares, lo que sugirió que en realidad se trataba de genes homólogos. Siguiendo este orden de ideas, introdujeron el gen *ey* en ratones solamente para comprobar que el ratón igualmente desarrolló un ojo. De haber evolucionado de manera independiente ambos ojos, es poco probable que el desarrollo del ojo haya caído en el mismo gen.

De este experimento surge la siguiente interpretación: el ancestro común de ambos animales tuvo ojos. Existe la posibilidad de que el ojo haya evolucionado de manera diferente debido a que la estructura entre ambas especies es diversa, sin embargo es también posible que el ancestro común haya presentado un ojo bastante “simple” convirtiendo esto en una homología. La evolución de los ojos en ambos taxones es más simple si pensamos en una maquinaria genética para especificar algo en el ojo (Goodman, C. y Coughlin, B. 2000. p. 581). La probabilidad de que se trate de genes homólogos es alta debido a que éstos actúan en la misma región de la cabeza de ambas especies. Por tal motivo, la homología entre estos dos animales, pues como menciona Ridley, las estructuras que no son homólogas en un nivel, lo serán en otro, en un nivel más abstracto (Goodman, C. y Coughlin, B. 2000. p. 581).

Se ha encontrado que existen más estructuras entre insectos y vertebrados que son homólogas debido al control genético en común, a diferencia de la creencia antigua sobre su analogía. Algunas de ellas son homólogas en un sentido específico mientras que otras sólo en un sentido abstracto.

1.2.4.3 Espina dorsal (tiempo de expresión)

En vertebrados, la espina dorsal es muy diferente entre especies pero incluso, lo es a lo largo de un mismo organismo. Estas diferencias aparecen desde los embriones. El límite entre las vértebras cervicales y torácicas está asociada con el límite anterior del gen *Hoxc6*. Éste es, probablemente, uno de los encargados de controlar el sistema que prende las vértebras torácicas en vertebrados y no las cervicales. Por tal razón un cambio evolutivo en la morfología de la espina fue producido, en un nivel genético, por un cambio en la

expresión espacial del gen *Hoxc6*. Debido a que las vértebras se desarrollan en una dirección anterior-posterior, si existe un retraso o falla en este gen, los límites entre las cervicales y el tórax se podría desplazar a la parte posterior de la espina. Por tal motivo, el tiempo en que se expresan los genes *hox* puede contribuir a la evolución morfológica.

En la década de los 90's, Maynard Smith y Szathmáry identificaron lo que ellos llamaron *transiciones mayores* en la evolución. Estos son eventos como el origen de la vida, los cromosomas, las células, la vida multicelular, el desarrollo de la reproducción sexual y demás, hasta llegar a un número aproximado de diez eventos. Todos, son parte aguas en la historia de la vida pues son cambios en la manera en que la herencia se lleva a cabo, sobre todo, entre la relación de genotipo y fenotipo. Con la genómica evolutiva y evo-devo es posible responder preguntas de la macroevolución.

La teoría evolutiva del desarrollo es pues, un enlace entre las investigaciones evolutivas y las que se han hecho en el terreno del desarrollo. Con esto, es claro que la división de estas dos ramas de la biología es difusa y que no se puede entender una explicación sin los antecedentes de la otra. Tener en cuenta esta teoría como marco teórico, permite a los biólogos hacer hipótesis, investigaciones y argumentaciones más incluyentes, en el terreno de la biología evolutiva.

Capítulo 2. Trabajos de Shinya Yamanaka y colaboradores

En este capítulo se mencionan los antecedentes que dieron paso a la conformación de las hipótesis generales y particulares de los trabajos de Yamanaka y colegas, tanto con células de ratón, como con células humanas; se revisan las preguntas y los objetivos que el equipo de trabajo se planteó para la investigación: se enlistan los métodos empleados para ambos trabajos. En tanto que un objetivo particular de este trabajo es dilucidar las razones por las cuales son necesarios para transformar una célula diferenciada a una pluripotente, es necesario conocer de dónde es que surge esta hipótesis y los métodos para llevar a cabo el trabajo. Además, el objetivo de este capítulo es describir en qué consisten y cómo se hicieron las investigaciones, con el fin de separar los componentes del estudio y entonces estudiar su estructura, para poder relacionarlo con la teoría evolutiva del desarrollo y, más ampliamente, con la evolución.

2.1 Marco teórico de Shinya Yamanaka: Antecedentes.

En su artículo del 2012 “Induced pluripotent stem cells: past, present, and future” Shinya Yamanaka menciona que, como cualquier avance científico, las iPSCs –*Induced pluripotent stem cells* por sus siglas en inglés; en español son células madre pluripotentes inducidas- se establecieron con base en numerosos descubrimientos anteriores. Aquí, el investigador japonés menciona tres trabajos como los más importantes en el desarrollo de dicha tecnología:

- La reprogramación por transferencia nuclear por John Gurdon en 1962.
- El descubrimiento de factores transcripcionales maestros por Stephan Schneuwly y colaboradores en 1987.
- La generación de ESCs⁷ y condiciones de cultivo que permiten mantener pluripotencia por M. Evans y M. Kaufman en 1981, G. Martin en el mismo año y Austin Smith y colaboradores en 1988.

⁷ Las células totipotenciales (Embryonic stem cells, ES cells) derivan de la masa celular interna del blastocisto en desarrollo y pueden ser propagadas en cultivo en un estado indiferenciado, mientras mantiene la capacidad de generar cualquier tipo celular del cuerpo (Boyer, L. *et al.* 2005).

Yamanaka menciona que la combinación de las primeras dos líneas de investigación permitieron generar la hipótesis de que la combinación de múltiples factores en los oocitos o en células totipotenciales son los encargados de reprogramar a las células somáticas a un estado embrionario y que el diseño de experimentos que permiten identificar dicha combinación era posible. La tercera línea de investigación, sobre las condiciones de cultivo para células pluripotenciales, permitió identificar los cuatro factores que generan a las iPSCs (Yamanaka, S. 2012).

En una figura del mismo artículo ilustra ocho temas y autores básicos que encaminaron a la generación de las iPSCs, primero con células de ratón (Yamanaka, S. 2006) y posteriormente en humano (Yamanaka, S. 2007). A continuación se enlistarán y describirán a grandes rasgos los ocho trabajos mencionados:

1. J. B. Gurdon, en su trabajo de 1962, menciona que un problema de la embriología era saber si la diferenciación de las células dependía de una restricción estable de la información genética contenida en su núcleo. De la misma manera, asegura que la técnica de trasplante nuclear había mostrado hasta qué punto el núcleo de las células diferenciadas podía promover la formación de diferentes tipos celulares.

En su trabajo, Gurdon describe diferentes experimentos para realizar trasplantes de núcleos desde una célula totalmente diferenciada. Señala que muchos de estos núcleos dieron resultados anormales después del trasplante, y diferentes tipos de experimentos fueron realizados para determinar la causa y el significado de estas anomalías.

Los animales utilizados para los experimentos pertenecían a la subespecie *Xenopus laevis* (rana), con células epiteliales intestinales de renacuajos debido a que ese es el momento final de diferenciación de muchas de las células endodérmicas cuyo núcleo ya había sido estudiado en experimentos de trasplantes en *X. laevis laevis*. Los núcleos de células diferenciadas y de blástula, que funcionaron como control, fueron trasplantados a huevos enucleados.

10 de 726 de las primeras transferencias del núcleo del intestino resultaron en renacuajos normales; los resultados, menciona Gurdon, deben ser considerados como una extensión de los previamente obtenidos a partir de células diferenciables del endodermo. Esto mostró que el núcleo puede ser responsable de la formación de células del epitelio

intestinal y, al mismo tiempo, posee la capacidad de formar otros tipos de células diferenciadas.

En la discusión, Gurdon menciona que la información genética del núcleo antes del trasplante se muestra por el rango de tipos celulares que sus productos mitóticos pueden formar una vez llevado a cabo el procedimiento, en tanto que la información genética que está en el núcleo no cambia como resultado de la transferencia nuclear. Por tanto, asume que la capacidad de desarrollo del núcleo no aumenta como resultado del trasplante. Si un núcleo transferido soporta el desarrollo de un renacuajo, esto es debido a que posee la información genética requerida para esto cuando estaba presente en la célula donadora y no adquiere información hasta después del trasplante.

De sus resultados, obtiene tres puntos concluyentes a pesar de que, señala, la evidencia no es fuerte:

- a) cerca del 7% de número total de núcleos del intestino trasplantados tienen la información genética necesaria para formar renacuajos normales.
- b) 13% de los huevos que recibieron de manera exitosa los núcleos trasplantados de intestino pueden dar lugar a renacuajos.
- c) La formación de renacuajos normales puede ser promovida por 24% de los núcleos del intestino que fueron trasplantados de manera exitosa, de la misma manera que en un estadio adecuado en su ciclo mitótico.

Gurdon menciona que hasta que el significado de los cambios nucleares estables se conozca, los resultados de la trasplantación nuclear parecen ser consistentes con la idea de que cambios estables que restringen la capacidad de desarrollo del núcleo, no son esenciales para que la diferenciación celular se lleve a cabo. Esta postura se relaciona con diferentes teorías de diferenciación.

Algo importante a resaltar es que Gurdon señala que la diferenciación celular es iniciada, muy probablemente, por el efecto que tiene el ambiente citoplasmático sobre el núcleo, por lo que el núcleo provee información genética específica promoviendo la formación de un tipo celular particular. Para esto, menciona que hay tres posibilidades para que esto ocurra:

- a) Los núcleos deben pasar por una pérdida progresiva de material genético, para que la diferenciación celular pueda darse a partir del material genético que está retenido

en núcleos diferentes. Gurdon menciona que, por los experimentos realizados, la evidencia indica que este punto es muy improbable pues el núcleo puede ser responsable de la diferenciación de un tipo celular mientras continúa teniendo la capacidad de formar otros tipos de células somáticas en el renacuajo.

- b) Una activación de ciertas partes del material genético debe tomar lugar, para que información genética específica pueda ser proveída por las partes no activadas del genoma.
- c) La información genética proveída por el núcleo es totalmente dependiente del ambiente citoplasmático en cualquier momento.

Los resultados son consistentes con cualquier teoría de diferenciación celular que no requiera que el núcleo de una célula diferenciada haya perdido su información genética necesaria para la formación de otros tipos celulares somáticos diferenciados.

En conclusión, los resultados del científico británico sirvieron para demostrar que el núcleo promueve la formación de células intestinales diferenciadas y que, al mismo tiempo, contiene la información genética necesaria para la formación de otros tipos de células somáticas diferenciadas en el renacuajo.

2. M.J Evans y M. H. Kaufman, mencionaban para 1981 que hasta ese momento no había sido posible establecer medios de cultivo para el crecimiento progresivo de células pluripotenciales *in vitro*, por lo que las líneas celulares habían sido obtenidas a partir de la formación *in vivo* de teratocarcinomas⁸. Los intentos pasados a esa fecha de obtener cultivos de células pluripotentes directamente de embriones de ratón no habían sido exitosos aunque células con apariencia similar habían sido reportadas.

Los investigadores hipotetizaron que el éxito dependía de tres factores: 1) el momento exacto en el que las células pluripotenciales capaces de crecer en cultivos de tejido existen en el embrión. 2) Explantación de un número grande de estas células precursoras de cada embrión. 3) Cultivo de tejido en condiciones que condujeran a la multiplicación más que a la diferenciación de estas células embrionarias.

⁸ Un teratocarcinoma es una forma maligna de un teratoma que se da en las células embrionarias de testículos y ovarios; se les conoce como tumores de células germinales. (Fuente: merriam-webster.com). Las células que se derivan de los teratocarcinomas reciben la abreviación de *EC cells*, *embryonal carcinoma cells*.

Su resultado fue lograr establecer un cultivo de tejido de líneas celulares pluripotentes que fueron aisladas directamente de cultivos *in vitro* de blastocisto de ratón. Las células podían diferenciarse *in vitro* o después de la inoculación en un ratón en forma de tumores. Para ese momento, ellos mencionan que las células de teratocarcinomas estaban siendo ampliamente utilizadas como un modelo de estudio de procesos del desarrollo de células embrionarias ya comprometidas o en diferenciación.

En ese mismo año, Galvin Martin publicó sus resultados al lograr el establecimiento de células que forman teratocarcinomas cuando se les inyecta a los ratones, a partir de embriones de ratón preimplantados (Figura 1). El objetivo de su investigación era describir un método que relacionara el cultivo en un medio condicionado para aislar y establecer líneas celulares pluripotentes con las propiedades de células madre de teratocarcinomas, provenientes de embriones de ratón *in vitro*. La pluripotencia de sus células troncales embrionarias fue concluyente por la observación de cultivos subclonales, derivadas de células aisladas, mismas que se pueden diferenciar en una gran variedad de tipos celulares.

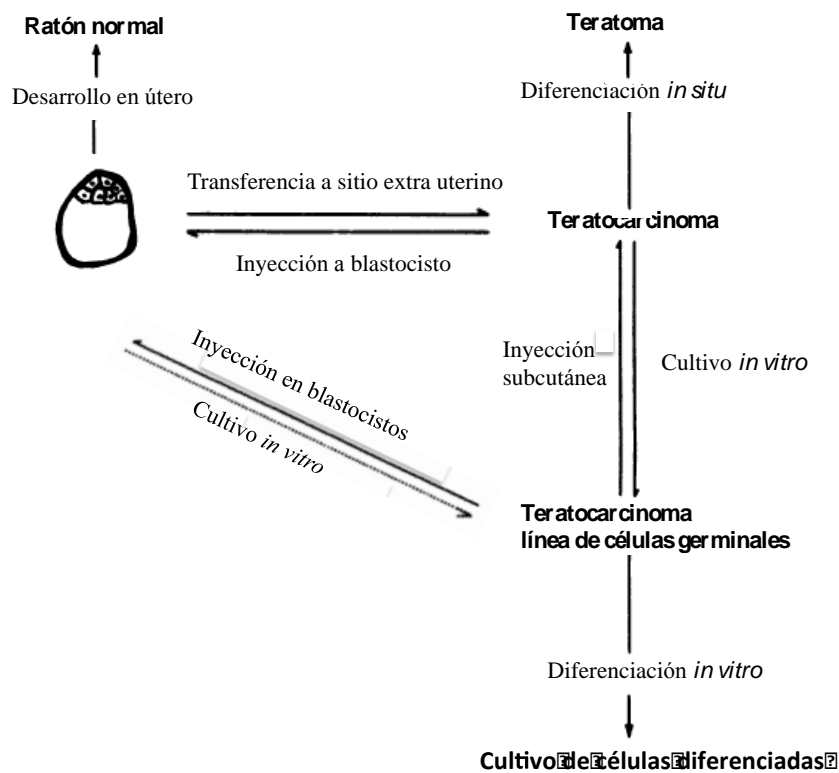


Figura 1. Método empleado por Galvin Martin donde muestra la relación entre embriones normales y células madre provenientes de teratocarcinomas. Esta imagen, como

menciona el autor, abre preguntas acerca del origen de las células madre de teratocarcinoma (Fuente: Martin, G. 1981).

Una hipótesis es que el tumor de células madre surge como consecuencia de un cambio epigenético estable y reversible en las células embrionarias pluripotentes (Feinberg, A.P. *et al.* 2006). Una idea alternativa es que las células embrionarias de carcinoma no se transforman pero representan una población selecta de células embrionarias normales que están programadas para dividirse hasta que reciban señales apropiadas para la diferenciación. Se asumió que el aumento de la concentraciones de factores que promovieran el crecimiento, con un suministro exógeno, podría resultar en una expansión de la población de stem cells *in vitro* en embriones normales.

El método de investigación consistió en el aislamiento de células madre embrionarias de una masa de células de blastocisto cultivado en un medio condicionado por un teratocarcinoma establecido. A partir de éste método, Martin sugirió que dicho medio condicionado podría contener un factor de crecimiento que estimulaba la proliferación o inhibía la diferenciación de células embrionarias pluripotentes, o ambos (Martin, G. 1981).

De las observaciones descritas, se demostró que el aislamiento de la masa de células internas del embrión, a partir de blastocisto de ratón, y su cultivo en un medio condicionado por una línea celular embrionaria establecida puede dar lugar a cultivos celulares con las características de células madre de teratocarcinoma de un ratón. Las propiedades incluyen morfología celular, pluripotencia y la habilidad de formar teratocarcinomas típicos cuando son inyectadas en los ratones. Además, se encontró que las células madre embrionarias expresaban el antígeno de superficie celular SSEA-1, común en las células de teratocarcinoma de embriones pero que no se encuentra en las células diferenciadas.

Martin menciona que este método debe ser útil no sólo para elucidar la relación entre las células madre de teratocarcinoma y sus progenitores embrionarios normales sino también para generar nuevas líneas celulares pluripotentes marcadas genéticamente, para que se estudien diferentes aspectos del desarrollo de mamíferos. Finalmente, asegura que el método descrito provee un medio para la necesidad de convertir un embrión en un tumor *in vivo*. Esto hace posible el aislamiento de células pluripotentes de embriones que no pueden formar teratocarcinomas directamente, cuando son trasplantadas a un sitio extra uterino.

3. En 1987, Walter Gehring, junto con S. Schneuwly y Roman Klemenz, lograron transformar las antenas de *D. melanogaster* en patas. Así mismo, encontraron que la parte dorsal de la cabeza puede ser transformada en una segunda estructura torácica, lo que indicó que el gen *Antennapedia* (*Antp*) especifica el segundo segmento torácico.

A partir del antecedente de estudios moleculares y genéticos que sugerían que el gen de *Antp* especificaba el segundo segmento torácico, los autores postularon que la transformación de las antenas en patas se debe a la expresión ectópica de la proteína *Antp*⁺. Propusieron que el fenotipo dominante no se debe a una alteración del producto del gen sino debido a una alteración de la expresión normal de la proteína *Antp*. Una segunda hipótesis es que el fenotipo dominante por ganancia de función fue causado por la sobreexpresión ectópica de la proteína bajo el control de cualquier promotor que pudiera ser expresado en la región de la antena en el momento adecuado del desarrollo. Dicho promotor debió estar activo en otros tejidos, pero el efecto estuvo limitado a las antenas si la proteína estaba expresada en el momento crítico cuando las antenas se determinan.

Para comprobar la hipótesis sobre la expresión ectópica, construyeron la fusión artificial de un gen donde el la zona que codifica para la proteína se fusionaría con el promotor.

Los resultados demostraron que los transformantes producen una proteína *Antp* que, después del shock de calor al que se les indujo, se expresa en el embrión y en la larva. Por tanto, la expresión ectópica inducida por calor de la proteína *Antp*⁺ resulta en la formación de piernas mesotorácicas en el lugar de las antenas, por la alteración del plan corporal.

Los autores señalan que el tiempo preciso de desarrollo en el que se da la transformación de patas por antenas es crítico. De la misma manera, concluyen que *Antp* controla la ruta de desarrollo y especifica no sólo las partes ventrales. Por tanto, la expresión ectópica de la proteína lleva a una transformación homeótica de segmento en términos de un modelo que asume que la interacción competitiva regulatoria interactúa entre los diferentes genes homeóticos. Finalmente, concluyen mencionando que después de analizar los circuitos genéticos que controlan el desarrollo, será posible entender los principios que delinear la especificación del plan corporal en términos moleculares y evolutivos.

4. En 1987, Robert Davis, Harold Weintraub y Andrew Lassar, lograron convertir, a partir de cDNA (DNA complementario), fibroblastos embrionarios de ratón en mioblastos, sugiriendo la alteración de uno o algunos *loci* regulatorios.

Su antecedente era el del trabajo de P. Jones (1979), donde mostraron que los clones miogénicos podían derivar de fibroblastos de la línea C3H10T1/2 (10T1/2), células embrionarias de ratón, siguiendo un tratamiento con 5-azacitidina.

El objetivo de Weintraub y colaboradores era identificar el *loci* relacionado con la transformación de las células 10T1/2 para determinar los mioblastos. Su hipótesis de trabajo fue que, a diferencia de las 10T1/2 no comprometidas, los mioblastos de proliferación derivadas de ellas, expresan de forma continua *loci* regulatorios que pueden activar la expresión de marcadores de un linaje específico en los mioblastos que proliferan y hacer de éstas, células competentes para expresar otros genes específicos de músculo cuando se les induce diferenciación.

A través de una descripción minuciosa del método empleado, los autores demostraron que la expresión de uno de los cDNAs transfectados a las células 10T1/2 es suficiente para convertirlas en mioblastos estables. Señalan que la miogénesis también fue inducida.

Como parte de la discusión, se menciona que *Myod1* es el gen responsable de la transformación de fibroblastos a mioblastos y que los cambios regulatorios dependen de la modificación de un repertorio de proteínas regulatorias presentes en las células. Con sus experimentos, demostraron que la similitud entre la región codificante de *Myod1* con las proteínas Myc puede ser importante en la explicación del antagonismo mutuo entre el crecimiento y la diferenciación, ya que se vio que c-Myc es inducida en una variedad de tipos celulares cuando entran a estado quiescente en el ciclo celular y su regulación es necesaria en la diferenciación.

En este trabajo se asegura que los datos no son suficientes para aceptar o negar la posibilidad de que *Myod1* es el gen activado por 5-azacitidina en las células 10T1/2. También se dice que no es claro si la miogénesis se puede controlar por un único gen maestro, *Myod1*, ya que no se sabe si puede activar el programa miogénico completo.

Lo más importante de este artículo es que los autores señalan que existe mucha evidencia en *Caenorhabditis elegans* y en *D. melanogaster* de que los genes regulatorios se

expresan en diferentes linajes celulares, dando soporte a las ideas clásicas de que el tipo celular está codificado por un subgrupo de combinaciones a partir de un conjunto de genes reguladores. Además, existe poca evidencia de que la especificidad celular está dada por genes determinantes, expresados en sólo un linaje celular. Hay pocos genes “determinadores” que parecen afectar sólo un tipo celular. Los autores mencionan que una combinación de esquemas y linaje celular son necesarios para generar identidad posicional en el embrión para cada célula. Eventualmente, esta información junto con señales locales puede llevar a la activación de sólo un o unos pocos genes específicos responsables de la determinación de un tipo celular particular.

5. En 1988, Austin Smith y colaboradores tuvieron como objetivo reportar que las células madre embrionarias (ES cells, *embryonic stem cells*, células totipotenciales⁹) con actividad inhibitoria para la diferenciación (DIA) están relacionadas en estructura y función con los entonces recién descubiertos factores regulatorios hematopoyéticos. Por lo que reportaron el descubrimiento de DIA y el factor inhibitorio de la interleucina humana, relacionando factores regulatorios multifuncionales con distintas actividades biológicas en células madre embrionarias y hematopoyéticas.

Concluyeron que la caracterización molecular de factores polipeptídicos que suprimen la diferenciación de células madre embrionarias tiene diferentes consecuencias importantes. Por tanto, la disponibilidad de factores recombinantes facilitará el crecimiento de poblaciones de células totipotenciales puras *in vitro* para análisis bioquímico y manipulación de líneas germinales.

6. Utilizando el método de la transferencia de un núcleo a un huevo no fertilizado, I. Wilmut, H. S. Campbell y colaboradores reportaron el nacimiento de ovejas vivas a partir de tres poblaciones establecidas a partir de glándulas mamarias adultas, fetos y embriones. En el trabajo se menciona que “El hecho de que una oveja haya derivado de una célula adulta confirma que la diferenciación de la célula no implica la modificación irreversible de material genético necesario para que el desarrollo se lleve a cabo”.

⁹ El término ES cell fue introducido para distinguir estas células derivadas de embriones de las células de teratocarcinoma, mencionadas ya en trabajos anteriores.

Como antecedente, los autores toman el trabajo de Gurdon, mencionado en el punto uno de este apartado. Mencionan que el trabajo con renacuajos implica la diferenciación de células a tejidos complejos y órganos pero no un desarrollo a la etapa adulta, lo que dejó abierta la pregunta de si la diferenciación del núcleo adulto podía ser reprogramado totalmente.

Señalan que anteriormente, reportaron el nacimiento de cinco ovejas después de la transferencia nuclear desde células embrionarias cultivadas y que fueron inducidas a quiescencia. Con esto, sugirieron que al inducir al donador para salir de la fase de crecimiento provocaba cambios en la estructura de la cromatina y que esto facilitaba la reprogramación de la expresión genética. Además, el desarrollo sería normal si el núcleo era usado desde una variedad de células donadoras diferenciadas.

El objetivo de este trabajo era investigar si el desarrollo a término, normal, sería posible cuando las células donadoras que derivaban de tejido fetal o adulto son inducidas para salir del ciclo de crecimiento y entrar a la fase G0 del ciclo celular antes de la transferencia nuclear.

Después de reportar el número de ovejas nacidas y factores relevantes como su peso o los estudios realizados posterior a la muerte, los autores señalan que su estudio sugiere que existe un avance si las células están quiescentes. Lo más importante es que sus resultados indican que los núcleos provenientes de una gran variedad de tipos celulares prueba que son totipotenciales después de aumentar las oportunidades para la reprogramación, al utilizar combinaciones apropiadas de los estadios del ciclo celular.

Además de reconocer que este método ofrece nuevas oportunidades en la biotecnología, las técnicas dan una oportunidad para estudiar la posible persistencia e impacto de cambios epigenéticos como el acortamiento de los telómeros o el imprinting.

Resaltan que la oveja nacida por transferencia nuclear a partir de células de glándulas mamarias es el primer mamífero en desarrollarse a partir de una célula derivada de un tejido adulto.

7. James Thomson y Jeffrey Jones propusieron en 1998 que las características esenciales de las células madre embrionarias debe ser a) derivación de la preimplantación o de la periimplantación embrionaria; b) proliferación indiferenciada prolongada; c) potencial de

desarrollo estable a partir de derivados de las tres capas germinales incluso después de cultivos prolongados.

En su artículo, explican que las células madre embrionarias son derivadas de células totipotenciales del embrión temprano de mamífero, capaces de proliferar y diferenciarse indefinidamente *in vitro*.

El objetivo de su trabajo era describir las líneas celulares humanas que cumplen con los criterios que definen a las células madre embrionarias.

Después de describir las líneas celulares utilizadas, éstas expresaron altos niveles de actividad telomerasa, de la proteína ribonucleica que agrega repeticiones de telomerasa a los extremos de los cromosomas. Este fenómeno está correlacionado con la inmortalidad de las líneas celulares humanas. También, las células mostraron marcadores superficiales que caracterizan a las células madre embrionarias no humanas como son el antígeno embrionario SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 y la fosfatasa alcalina. Por otro lado, en común con las células humanas, las células no diferenciadas no mostraron SSEA-1, mientras que las diferenciadas sí lo presentaron. Las células de ratón, las células madre embrionarias y las células derivadas de teratocarcinomas (*EC cells*, *embryonal carcinoma cells*) expresaron SSEA-1 pero no expresaron SSEA-3 o SSEA-4, lo que sugiere que las especies difieren en el desarrollo de ratón y humano.

Además de otras características, los autores mencionan que las células madre embrionarias humanas (hES cells, por sus siglas en inglés *human embryonic stem cells*) deben ofrecer pistas en los eventos del desarrollo que no pueden ser estudiados directamente en los embriones humanos pero que tienen consecuencias importantes en áreas clínicas. También mencionan que muchas enfermedades como el Parkinson resultan de la muerte o deficiencia de uno o algunos tipos celulares. El remplazo de esas células podría ofrecer un tratamiento de por vida. Esta tecnología evitaría el rechazo inmune de células trasplantadas y para demostrar la eficacia y seguridad de las terapias basadas en estas células.

Los autores concluyen que el progreso en la biología básica del desarrollo está avanzando a una gran velocidad y las células madre embrionarias humanas serán el vínculo con el progreso, en la prevención y en el tratamiento de enfermedades humanas.

8. En 2001, Takashi Tada y colaboradores establecieron un sistema experimental, el cual reproduce la reprogramación nuclear de células somáticas *in vitro* al fusionar timocitos humanos con células embrionarias humanas.

En total, de los 31 clones híbridos, 17 tenían al menos uno de los rearreglos, por lo que las células madre embrionarias hibridaron con los núcleos de los timocitos después de la diferenciación con células linfoides.

Lo interesante es que para visualizar la reprogramación del núcleo de las células somáticas, utilizaron un transgen que contenía *Oct4*-GFP, ya que la expresión de *Oct4* es única para las células germinales, para los embriones preimplantados y el epiblasto de embriones postimplantados. Por tanto, la actividad de *Oct4* es un marcador ideal para la identificación de células totipotenciales y pluripotenciales.

Con sus experimentos, los autores concluyen que las células madre embrionarias tienen la capacidad para reprogramar al menos algunos aspectos del núcleo somático *in vitro*, dando un sistema experimental que puede ser manipulado para investigar los mecanismos moleculares relacionados.

2.2 Propuesta de investigación

Yamanaka toma en cuenta todos estos antecedentes para formular su investigación. En el artículo del 2006 con células de ratón, Yamanaka y Kazutoshi Takahashi tienen la hipótesis general de que “los factores que juegan papeles importantes en el mantenimiento de la identidad de las células madre embrionarias también tienen papeles esenciales en la inducción de pluripotencia en células somáticas”. Los autores retoman los antecedentes antes detallados y, además, se basan en trabajos realizados por otros autores con factores de transcripción que mantienen la pluripotencia en embriones y células madre embrionarias, y genes específicos de células totipotenciales que contribuyen al mantenimiento de su fenotipo y a su rápida proliferación en cultivo. La pregunta que buscaron responder los autores con toda la información recabada, era si sería posible inducir la pluripotencia a partir de fibroblastos adultos de ratón en condiciones de cultivo.

Ya para el trabajo de 2007 con células humanas, Yamanaka y colegas no dan una hipótesis textual debido a que es una continuación del trabajo anterior. Si se toma esto en cuenta, a la hipótesis se le debe agregar los cuatro factores descubiertos anteriormente. Por

tanto, la pregunta a responder era saber si se podrían generar células iPS humanas a partir de los mismos factores empleados en ratones, *Oct 3/4*, *Sox2*, *Klf4*, y *c-Myc* a través de una optimización de la transducción retroviral.

A lo largo de ambos trabajos surgen preguntas nuevas y por tanto, hipótesis nuevas. Estas preguntas se revisarán en el apartado de los objetivos.

Para la discusión del trabajo del 2006, los autores mencionan que una pregunta sin responder es si los cuatro factores identificados juegan papeles importantes en la reprogramación inducida por la fusión con células madre embrionarias o por la transferencia nuclear a los oocitos. Con esto de partida, señalan que es razonable especular que los cuatro factores encontrados están relacionados con la maquinaria de reprogramación que existe en las células madre embrionarias.

Hipótesis importantes son las que se tienen a futuro, pues mencionan que posiblemente, su descubrimiento tendrá muchas aplicaciones en tanto que encontraron genes transferidos de manera natural y que funcionan como reporteros con otros genes de las células madre embrionarias. Con las líneas que cierran el trabajo del 2006 afirman que el hallazgo permitirá la creación de células pluripotentes desde células somáticas de pacientes, idea que fue respondida en gran medida en el trabajo del 2007, ya que se lograron obtener neuronas y células de corazón a partir de células epiteliales.

De cualquier manera, los autores señalan que el uso de integraciones retrovirales acarrea problemas en el sentido de que se ha visto que aumentan el riesgo de generación de tumores, situación que debe ser solucionada para la aplicación en terapias humanas. Por tanto, sugieren el uso de otros métodos que no impliquen retrovirus para inducir *Oct 3/4*, *Sox2* y *Klf4*, (ya que se ha descubierto un método no retroviral para *Myc*) como puede ser adenovirus o proteínas recombinantes permeables. Además de esto, proponen que debe ser posible identificar pequeñas moléculas que puedan inducir a las células iPS, sin necesidad de una transferencia genética. Dicho trabajo lo cierran con una recomendación que también esconde una hipótesis pues mencionan que “estudios futuros son esenciales para determinar si las células iPS humanas pueden reemplazar a las células madre embrionarias de humanos en aplicaciones médicas”.

2.3 Objetivos

Ambos artículos cuentan con objetivos generales y muchos particulares. Todos responden a preguntas puntuales. Cabe destacar que en artículo del 2007, los diferentes objetivos son más evidentes por la redacción del artículo.

El objetivo general del estudio con células de ratón fue examinar si los factores pueden inducir pluripotencia en células somáticas; el objetivo general del artículo es demostrar la inducción de células madre pluripotentes en embriones de ratón o fibroblastos adultos por cuatro factores, *Oct 3/4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*, bajo condiciones de cultivo.

Por su parte, el objetivo general del estudio publicado en 2007 fue buscar generar células iPS a partir de células somáticas de adultos humanos, al optimizar la transducción retroviral en fibroblastos humanos y las condiciones de cultivo; el objetivo general de la publicación fue demostrar la generación de células iPS a partir de fibroblastos dérmicos de adultos humanos con los mismos cuatro factores empleados en ratones: *Oct 3/4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*.

Los objetivos generales de ambos artículos son congruentes con la hipótesis general de los dos trabajos: “los factores que juegan papeles importantes en el mantenimiento de la identidad de las células madre embrionarias también tienen papeles esenciales en la inducción de pluripotencia en células somáticas”. Esto es porque no sólo se habla de que existen factores, mencionados de manera literal en los objetivos, que mantienen la identidad de las células madre, sino que éstos mismos son esenciales para la inducción.

Como se mencionó en el apartado de las hipótesis, a lo largo del trabajo surgen preguntas y cada una de ellas da lugar a un objetivo. A continuación se enlistan los objetivos que surgieron a lo largo de cada uno de los trabajos.

Inducción de células madre a partir de células de ratón

- Selección y evaluación de 24 genes como candidatos para factores que inducen la pluripotencia en células somáticas: desarrollo de un sistema que pudiera detectar el estado de pluripotencia inducida.

- Determinación de la importancia de cada uno de los factores, de manera individual: examinación del efecto resultante al retirar cada uno de los factores, de los 24 candidatos en las colonias.
- Examen de la formación de colonias a partir de la eliminación de cada uno de los factores, en un subgrupo de 10 factores, en las colonias.
- Examen para comprobar si los marcadores genéticos de las células madre embrionarias se expresan en las células iPS.
- Comparación la expresión genética global de las células madre embrionarias, de las células iPS y de las MEF¹⁰_s Fbx15^{βgeo/βgeo} utilizando microarreglos.
- Examinación de la pluripotencia de las células iPS por la formación de teratomas.
- Caracterización de la expresión de los cuatro factores en las células iPS.

Inducción de células madre a partir de células humanas

- Optimizar los métodos de transducción en fibroblastos dérmicos de humanos adultos (HDF, por las siglas en inglés de *Human Dermal Fibroblast*).
- Generación de células iPS a partir de HDF con la ayuda de retrovirus que contienen los cuatro factores.
- Caracterización genética y fenotípica de las células inducidas para demostrar su parecido con las células madre embrionarias humanas.
- Análisis de la situación epigenética de los promotores en las células iPS para su comparación con las células madre embrionarias humanas.
- Determinación de la habilidad para la diferenciación de las células iPS humanas *in vitro* y formación de células de las tres capas germinales.
- Examinación de la posibilidad de inducción de las células iPS para la diferenciación y formación de células neuronales y cardíacas.
- Probar la pluripotencia *in vivo* a través del trasplante de células iPS humanas a ratones; generar teratoma a partir de células iPS humanas.

¹⁰ *Mouse Embryonic Fibroblast*, MEF.

- Probar la integración de los cuatro retrovirus; demostrar que no existe contaminación cruzada.
- Demostración de que las células iPS pueden generarse de otras células somáticas huamas diferentes de los fibroblastos.

Todos los objetivos particulares contribuyen a contestar la pregunta general de que los factores que mantienen la identidad de células madre tienen un papel en la pluripotencia. Cada uno de ellos aporta información para demostrar que se ha logrado inducir de manera exitosa células que tienen un genotipo y fenotipo casi similar al de las células madre.

2.4 Procedimientos

A continuación, se enumerarán los pasos seguidos en cada uno de los artículos como parte del método. Cada punto corresponde con una pregunta y por tanto generó un resultado. El resultado de un procedimiento conduce a una nueva pregunta, hasta que, en conjunto, responden a la pregunta general de cada trabajo.

Inducción de células madre a partir de células de ratón

1. Se seleccionaron 24 genes como candidatos para factores que inducen pluripotencia en
2. células somáticas. Para evaluar estos 24 candidatos, se desarrolló un sistema de ensayo en donde la inducción del estado pluripotente podía ser detectado por la resistencia a G418¹¹. Se insertó al vector β geo en el gen *Fbx15*¹² por recombinación homóloga. Las células madre embrionarias homócigas fueron resistentes para altas concentraciones de G418, mientras que las células somáticas derivadas de *Fbx15* β geo/ β geo fueron sensibles a concentraciones normales de G418.

¹¹ G418 es un antibiótico que bloquea la síntesis de polipéptidos al inhibir la elongación. Es utilizado en investigaciones para seleccionar células modificadas por ingeniería genética.

¹² Fbx15 es una proteína que se expresa en células ES indiferenciadas y durante la coexpresión de Oct 3/4, c-Myc, Klf4 y SOX2, cuatro genes importantes para la autorenovación de las ES y para la represión de la diferenciación.

2. Se introdujeron cada uno de los 24 genes candidatos a los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) desde embriones *Fbx15*^{βgeo/βgeo} por transducción retroviral. No se obtuvieron colonias resistentes a medicamentos, indicando que ningún factor individual era suficiente para activar el locus *Fbx15*. La transducción de los 24 candidatos juntos generó 22 colonias resistentes a G418. Los experimentos se repitieron y se observaron 29 colonias resistentes a G418, de las que se tomaron 6 colonias. Los autores designaron a estas células como iPS-MEF24. La RT-PCR (análisis de expresión) demostró que éstas células expresaban marcadores de células madre embrionarias, como *Oct3/4*. El análisis de secuenciación por bisulfito demostró que los promotores de *Fbx15* y de *Nanog* estaban desmetilados en las células iPS. El promotor de *Oct3/4* se mantuvo metilado. Esos resultados muestran que alguna combinación de los 24 candidatos inducen la expresión de células madre embrionarias en cultivos de MEF.
3. Para determinar cuál era la combinación de los 24 factores críticos para la inducción, se examinó el efecto de la eliminación de factores individuales del total en las colonias G418. Se identificaron 10 factores, pues su eliminación resultaba en una nula formación de colonias. La combinación de estos 10 factores produjeron más colonias de células madre embrionarias que las que tenían 24 factores.
4. Se examinó la formación de colonias después de la eliminación de factores individuales de la combinación de 10 factores en las MEF. No se formaron colonias resistentes a G418 cuando se removió *Oct3/4*, *Klf4* y *Sox2*. Cuando se removió *c-Myc*, se obtuvieron colonias aplanadas. Esto indica que estos cuatro factores juegan un papel importante en la generación de células iPS a partir de MEFs.
5. La combinación de los cuatro genes produjo un número de colonias G418 similar a las observadas con la que contenía los 10 factores. Esto demuestra que las células iPS pueden ser inducidas a partir del cultivo de MEFs por la introducción de cuatro factores de transcripción: *Oct3/4*, *Klf4*, *Sox2* y *c-Myc*, pues éstos activan el locus *Fbx15*.
6. Se realizó un RT-PCR para examinar si los genes marcadores de células embrionarias humanas se expresaban en las células iPS (Figura 3A). El análisis de

precipitación de cromatina mostró que los promotores de *Oct3/4* y de *Nanog* mostraban acetilación en la histona H3 y disminución en la dimetilación de la lisina 9 de la histona H3. Estos análisis demostraron que las iPS-MEF4 e iPS-MEF10 son similares pero no idénticas a las células madre embrionarias.

7. Se comparó el perfil de expresión global de células madre embrionarias, células iPS y las MEF *Fbx15* ^{β_{geo}/β_{geo}} utilizando microarreglos de DNA. El análisis de correlación de Pearson reveló que las células iPS están agrupadas con las células madre embrionarias pero separadas de los fibroblastos y de sus derivados, es decir que las células iPS son similares, pero no idénticas, a las células madre embrionarias. (Figura 5).
8. Se examinó la pluripotencia de las células iPS por la formación de teratomas. Los datos demostraron que la mayoría de los clones iPS-MEF10 e iPS-MEF4 mostraban pluripotencia. Los tres factores *Oct3/4*, *c-Myc* y *Klf4* pueden inducir la expresión de algunos genes marcadores de células madre embrionarias pero no pueden inducir pluripotencia. Estos datos confirmaron la pluripotencia de iPS-MEF10 y de iPS-MEF4 pero la nulipotencia de iPS-MEF3 *in vitro*.
9. Se introdujo los cuatro factores seleccionados en los fibroblastos de tipo TTFs a ratones *Fbx15* ^{β_{geo}/β_{geo}} de 7 semanas. También se introdujeron los cuatro factores a las TTFs a ratonas hembras *Fbx15* ^{β_{geo}/β_{geo}} de 12 semanas, que además expresaban la proteína verde fluorescente (GFP). Un RT-PCR demostró que los clones expresaron la mayoría de los genes marcadores de células madre embrionarias en altos niveles. Posterior al trasplante de células a otros ratones y la obtención de células de las tres capas germinales, los resultados mostraron que los cuatro factores seleccionados pueden inducir células pluripotentes a partir de cultivos de fibroblastos de ratón.
10. Se caracterizó la expresión de los cuatro factores y otros en las células iPS. La PCR confirmó que la expresión endógena de *Oct3/4* y *Sox2* era menor en las células iPS que en las células madre. El Western Blot mostró que las cantidades totales de proteína de los cuatro factores en las células iPS era comparable a aquellos de los de las células madre embrionarias. El southern blot mostró que cada clon de iPS tiene un patrón único de integración de transgene. Los resultados eliminan la posibilidad

de que las células iPS están contaminadas de células madre embrionarias preexistentes.

Inducción de células madre a partir de células de humano

1. Introducción de proteína verde fluorescente (GFP) en fibroblastos dérmicos de humanos (HDF) con retrovirus anfótropo producido por las células PLAT-A para optimizar los métodos de transducción. Como resultado se vio que en los fibroblastos embrionarios de ratón, más del 80% expresaron la GFP mientras que en el caso de los HDF, menos del 20% expresaron la proteína.
2. Para mejorar la eficiencia de la transducción, los autores introdujeron el receptor de ratones para los retrovirus Slc7a1¹³ a las HDF con lentivirus. Esto ofrece una eficiencia a la transducción del 60% con una intensidad igual a la de las MEF.
3. Introdujeron los retrovirus con los factores *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-Myc* en las HDF-Slc7a1. Dos semanas después, aparecieron algunas colonias granuladas diferentes en morfología a las células madre embrionarias humanas. En el día 25, detectaron distintos tipos de colonias delgadas y similares a las colonias de células madre embrionarias humanas. Después de algunos días y de la aparición de características similares entre los dos tipos de células, el resultado de esta parte del estudio, los autores decidieron referirse a las HDF como células iPSC.
4. Se realizó una RT-PCR para demostrar que las células iPS expresan muchos genes marcadores de células madre embrionarias indiferenciadas como *OCT3/4*, *SOX2* y *NANOG*, entre otros. Por un western blot se midieron los niveles de proteínas para mostrar que son iguales entre células iPS y las células madre embrionarias humanas.
5. Se realizó la secuenciación con bisulfito para evaluar la metilación en los promotores de los genes asociados con pluripotencia. Los resultados mostraron una metilación pobre. Esto demostró que los promotores están activos en las células iPS.

¹³ Funciona como un receptor de leucemia de un retrovirus ecotrópico. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SLC7A1>

6. El análisis con luciferasa mostró que los promotores de genes que promueven la indiferenciación tienen altos niveles de actividad en las células iPS y en las células de carcinoma.
7. El análisis con CHIP sirvió para analizar las modificaciones de histonas en las células iPS humanas. Encontraron que el estado de las modificaciones de histonas es característico de las células madre embrionarias humanas.
8. Para determinar la capacidad de diferenciación de células iPS humanas *in vitro*, los autores utilizaron cultivo a flote para formar cuerpos embrionarios (EBs). Las células mostraron diferentes tipos celulares de las tres capas germinales, lo que significó que las células se pueden diferenciar en cultivo.
9. Se examinó si la diferenciación por linaje directo de las células iPS puede ser inducido por métodos de reporte para las células madre embrionarias humanas. Las células se dispersaron drásticamente, y se observaron algunas estructuras neuronales. Los resultados mostraron que las células iPS se diferenciaron a células neuronales.
10. Se examinó la diferenciación de células cardíacas a partir de células iPS. Una RT-PCR mostró que estas células expresan marcadores de cardiomiocitos. Esto muestra que las iPS se pueden diferenciar a miocitos cardíacos *in vitro*.
11. Para probar la pluripotencia *in vivo*, se trasplantaron células iPS humanas en ratones inmunodeficientes. Nueve días después se formó un tumor, mismo que contenía diferentes tejidos.
12. Para identificar que los cuatro retrovirus se habían integrado de manera correcta y que no se había dado una contaminación cruzada, se realizó una PCR de material genético de las células iPS. Un southern blot con un cDNA de *c-Myc* mostró que cada clon tenía un patrón único de sitio de integración retroviral.
13. Por último, se tomaron células de tejido de las articulaciones de hombres caucásicos de 69 años para formar células iPS, siguiendo el método empleado con los fibroblastos.

Con esto, podemos observar que los objetivos y los métodos son congruentes con las preguntas de investigación en tanto que buscan responder la pregunta de investigación: la posibilidad de reprogramar células diferenciadas a partir del uso de unos cuantos factores.

Capítulo 3. Análisis de resultados

Una vez revisado el marco teórico que permitió generar las preguntas de investigación, las hipótesis que buscan responder si es posible reprogramar células diferenciadas con algunos factores de transcripción y el método empleado, congruente con las preguntas iniciales, este capítulo muestra la información obtenida, resultado de ambas investigaciones. Aquí, el objetivo es desmenuzar la información y entender las partes de la investigación, es decir, cómo una pregunta particular arrojó un resultado congruente y éste, a su vez, generó una nueva pregunta particular. La suma de todas las preguntas y resultados, responde la incógnita general de ambos trabajos. En este capítulo se revisan cada uno de los resultados obtenidos y las preguntas que surgieron con cada uno, las técnicas empleadas y el significado de los resultados. Al igual que el capítulo anterior, aquí se hace una descripción de la segunda y última parte de ambos trabajos, para conocer sus componentes y entonces relacionarlos con la teoría evolutiva del desarrollo.

3.1 Resultados

3.1.1 Resultados generales

El resultado general que se obtuvo en el trabajo de 2006 con células de ratón, fue la inducción de pluripotencia a partir de embriones de ratón o fibroblastos adultos por la inducción y combinación de cuatro factores: *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*. Aunado a esto, se encontró que *Nanog* es dispensable. Las células obtenidas, a las que denominaron iPS, exhibieron la morfología y las propiedades de crecimiento de las células madre embrionarias, además de que expresan genes marcadores de las mismas. El trasplante subcutáneo de las células iPS en ratones desnudos resultó en la formación de tumores que contenían una variedad de tejidos presentes en las tres capas germinales. Posterior a la inyección en blastocistos, las células iPS contribuyeron al desarrollo embrionario del ratón.

Por su parte, en el trabajo del 2007, se obtuvo como resultado general la generación de células iPS a partir de fibroblastos dérmicos de adultos humanos y otras células somáticas, con los mismos cuatro factores utilizados en el trabajo anterior: *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-Myc*. Las iPS humanas eran similares a las células madre embrionarias humanas en morfología, proliferación, antígenos de la superficie, expresión genética, situación

epigenética de los genes de la pluripotencia, y la actividad de la telomerasa. Al igual que en el estudio anterior, las células se pudieron diferenciar en tipos celulares de las tres capas germinales *in vitro* y en teratomas.

3.1.2 Descripción de resultados particulares

A continuación se enumerarán los resultados obtenidos a lo largo de cada uno de los experimentos. Posteriormente, el análisis relacionará el método con los resultados, así como los objetivos y las hipótesis.

Resultados inducción de células de ratón

1. Las células madre embrionarias homocigas con la construcción de β_{geo} ($Fbx15^{\beta_{geo}/\beta_{geo}}$) fueron resistentes a concentraciones extremadamente altas de G418 (arriba de 12 mg/ml) mientras que las células somáticas de ratón derivadas de $Fbx15^{\beta_{geo}/\beta_{geo}}$ fueron sensibles a concentraciones normales de G418 (Fig. 2A).
2. No se obtuvieron colonias resistentes al fármaco con un factor único (de los 24), lo que indica que un gen único no era suficiente para activar el locus *Fbx15*.
3. La transducción de los 24 candidatos juntos generó 22 colonias resistentes a G418 (Fig. 2B). De los 12 clones que se continuaron cultivando bajo la selección, 5 exhibieron morfología similar a las células madre embrionarias, incluyendo una forma redondeada, un nucléolo largo y un citoplasma escaso (Fig. 2C y D).
4. Los análisis de la expresión (RT-PCR) revelaron que los clones iPS-MEF24 expresaban marcadores de células madre embrionarias, incluyendo *Oct3/4*, *Nanog*, *E-Ras*, *Cripto*, *Dax1*, *Zfp296* y *Fgf4*(Fig. 2E).
5. La secuenciación genómica por bisulfito demostró que los promotores de *Fbx15* y *Nanog* estaban desmetilados en las células iPS. En contraste, el promotor *Oct3/4* se mantuvo metilado en estas células. Estos datos indicaron que alguna combinación de estos 24 factores candidatos induce la expresión de los genes marcadores de células madre embrionarias en cultivo de MEF (Fig. 2F).

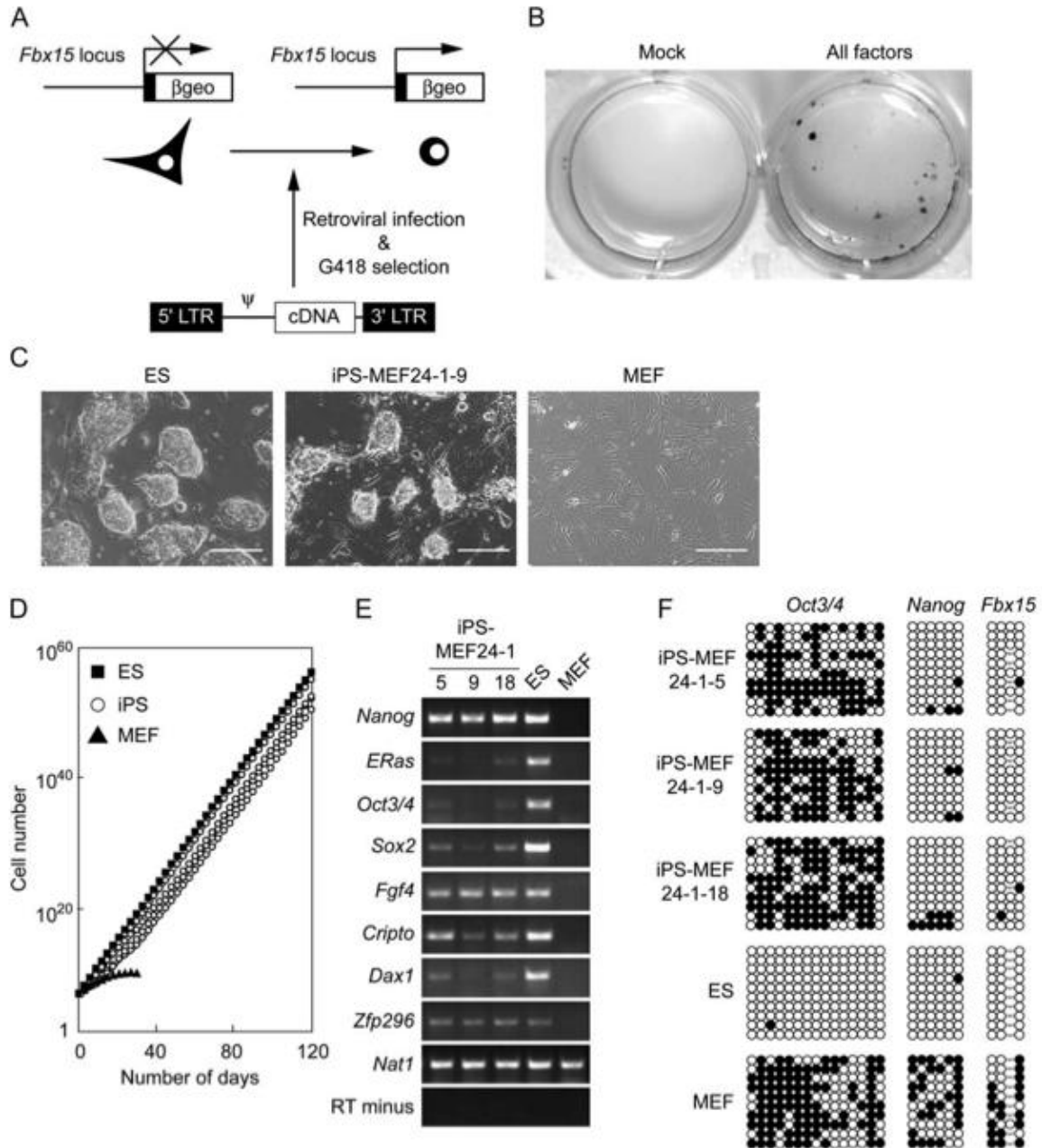


Figura 2. Generación de células iPS a partir de cultivos de MEF por 24 factores. En el apartado **A**, se observa la estrategia utilizada para probar a los factores candidatos. La imagen muestra que en una célula diferenciada, *Fbx15* no se expresa, pero cuando se le introduce un retrovirus y G418, ésta comienza la transcripción de *Fbx15* y del vector introducido. En el apartado **B** se observan las colonias resistentes a G418, 16 días después de la transducción de los 24 factores. Del lado izquierdo se observa el que no contiene la transducción y del lado derecho el que sí. En el apartado **C** se observa la morfología, de izquierda a derecha, de las células madre embrionarias, de las células iPS

(iPS-MEF24) y de las MEF. La morfología de la segunda con la primera son más parecidas debido a la inducción. La imagen **D** muestra la curva de crecimiento de las células madre embrionarias, de las células iPS (iPS-MEF24) y de las células MEF. El resultado es congruente con la imagen anterior, en donde las células iPS se parecen a las células madre embrionarias. La imagen **E** muestra el análisis RT-PCR de los genes marcadores de las células madre embrionarias (iPS-MEF24), de las células madre embrionarias y de las MEF, donde estas últimas no presentan a los genes propios de células indiferenciadas. Finalmente, en la imagen **F** se observa la secuenciación genómica con bisulfito de las regiones de los promotores de *Oct3/4*, *Nanog* y *Fbx15* en las células iPS (iPS-MEF24), ES y MEF. Los círculos blancos muestran los dinucleótidos CpG desmetilados, mientras que los círculos negros los dinucleótidos metilados. Las células madre tienen los tres promotores altamente desmetilados, mientras que esto sólo ocurre con las células iPS en *Nanog* y en *Fbx15*. Las MEF tienen los tres genes metilados.

6. Identificaron 10 factores, pues de su eliminación del grupo de transducción resultó en la formación nula de colonias, 16 días después de la transducción (Fig.3B). La combinación de estos 10 genes produjo más colonias parecidas a células madre embrionarias que lo que hizo la transducción de los 24 genes juntos (Fig. 3A).
7. Las colonias resistentes a G418 no se formaron cuando *Oct3/4* o *Klf4* fueron removidos. La remoción de *Sox2* resultó en la formación de sólo algunas colonias resistentes a G418. Cuando se removió *c-Myc*, las colonias resistentes a G418 emergieron pero tenían una morfología aplanada, no característica de las células madre embrionarias. La remoción de los factores remanentes no afectó de manera significativa el número de colonias. Estos resultados indicaron que *Oct3/4*, *Klf4*, *Sox2* y *c-Myc* juegan un papel importante en la generación de células iPS a partir de MEF (Fig. 3C).
8. La combinación de los cuatro genes produjo un número de colonias resistentes a G418 similar al observado con la combinación de los 10 genes. Estos datos demostraron que las células iPS pueden ser inducidas a partir de cultivo MEF por la introducción de estos cuatro factores de transcripción.

9. Los resultados a continuación muestran que la combinación de *Oct3/4*, *c-Myc* y *Klf4* pueden activar el locus *Fbx15* pero el cambio inducido por estos tres factores es diferente a los vistos con iPS-MEF4 y iPS-MEF10 (Fig. 3D).

- I. La combinación de dos factores no podía inducir la formación de colonias resistentes a G418. Dos combinaciones de tres factores – *Oct3/4*, *Sox2* y *c-Myc* o *Klf4*, *Sox2* y *c-Myc* – generaron una colonia pequeña en cada caso, pero no pudieron ser mantenidas en cultivo.
- II. Con la combinación de *Oct3/4*, *Sox2* y *Klf4* se observó la formación de 36 colonias resistentes a G418, que presentaron una morfología no característica de células madre embrionarias.
- III. Con la combinación de *Oct3/4*, *c-Myc* y *Klf4* se observó la formación de 54 colonias resistentes a G418, de las que se escogieron 6. Los clones se pudieron mantener a través de algunas generaciones, la morfología de estas células (iPS-MEF3) difirieron de las iPS-MEF4 y de las iPS-MEF10, además de que presentaron una superficie rugosa.

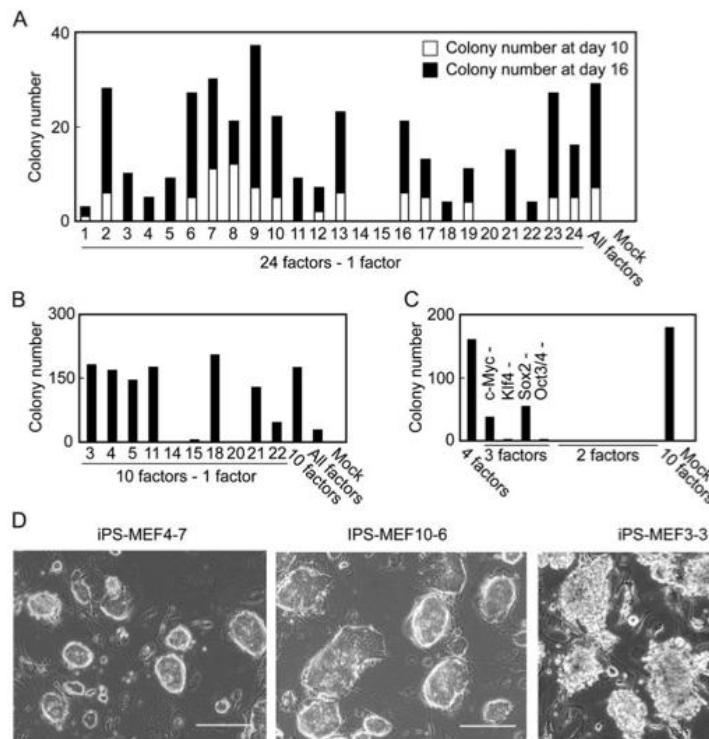


Figura 3. Elección de factores candidatos En la imagen **A** se aprecia cada una de las colonias, en la barra blanca a los 10 días de cultivo y en negro a los 16. El número del

factor en el eje X indica cuál era el que esa colonia no contenía y en total suman 24 colonias resistentes a G418. El factor 14 corresponde a *Oct3/4*, el 15 a *Sox2*, el 20 a *Klf4* y el 22 a *c-Myc*. En éste último existió crecimiento, mencionado en los resultados, pero las células no tenían características de células madre embrionarias. En la imagen **B**, en la gráfica de la izquierda, se observan los 10 factores elegidos para restringir la agrupación de genes. Los cuatro previamente mencionados, tienen un patrón similar al que presentaron con la agrupación de 24. Este efecto es aún más notorio en la imagen **C**, donde se les separó en grupos de cuatro, tres y dos. Finalmente, en la imagen **D** se aprecia la morfología de las iPS-MEF4, iPS-MEF10 y las iPS-MEF3, la cual varía de clon a clon.

10. La expresión de algunos genes marcadores, incluyendo *Oct3/4*, era mayor en los clones iPS-MEF4-7, iPS-MEF 10-6 e iPS-MEF 10-7 que en el resto de los clones. *Sox2* sólo se expresó en iPS-MEF 10-6 (Fig. 4A).
11. Los análisis de precipitación de la cromatina mostraron que los promotores de *Oct3/4* y *Nanog* tenían un aumento en la acetilación de la histona H3 y disminuyó la dimetilación de la lisina 9 de la histona H3 (Fig. 4B y C).
12. Las células iPS-MEF4 y las células iPS-MEF10 fueron positivas para la fosfatasa alcalina y para SSEA-1, y mostraron una actividad alta de telomerasa. Esto demuestra que las células iPS-MEF4 e iPS-MEF10 son similares, pero no idénticas a las células ES (Fig. 4D).

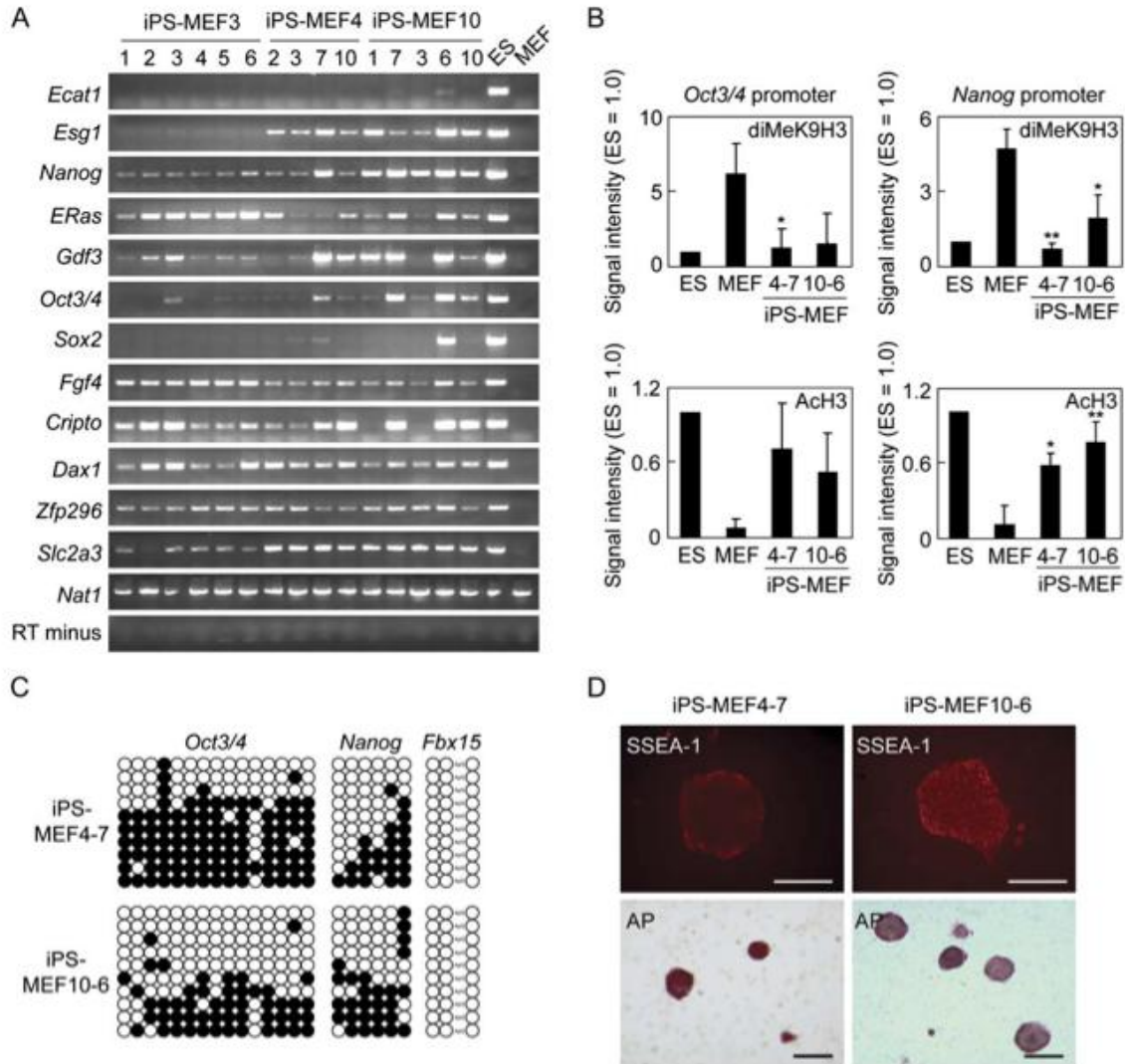


Figura 4. Perfil de expresión genética de las células iPS. La imagen **A** muestra el resultado de la RT-PCR de los genes de las células iPS, de las células madre embrionarias y de las MEFs, donde se ve que todos los genes marcadores de células madre embrionarias se expresaron, menos *Ecat1*. En la imagen **B** se observa el resultado de la inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para los promotores de *Oct3/4* y de *Nanog*; se analizó el estado de la lisina 9 de la H3 y la acetilación de la H3 en células madre embrionarias, células MEFs e iPS (MEF4 y MEF10). Aquí se ve que la acetilación de la H3 aumentó y que la dimetilación de la lisina 9 disminuyó. En la imagen **C** se observa el análisis por secuenciación con bisulfito de los promotores de *Oct3/4*, *Nanog* y *Fbx15* en las células iPS-MEF4 y -MEF10. Los dinucleótidos en estos promotores se mantuvieron parcialmente metilados en estos promotores. Finalmente, la imagen **D**

muestra los clones iPS-MEF4 y -MEF10 con anticuerpos que marcaron a SSEA-1 ya la fosfatasa alcalina, demostrando que fueron positivas para ambas.

13. Las células iPS-MEF3 son sustancialmente diferentes a las iPS-MEF10 y a las iPS-MEF4.
14. Los análisis de correlación de Pearsons revelaron que las células iPS están agrupadas cerca de las células madre embrionarias pero separadas de los fibroblastos y sus derivados. Los datos confirmaron que las células iPS son similares pero no idénticas a las células madre embrionarias (Fig. 5A y B).

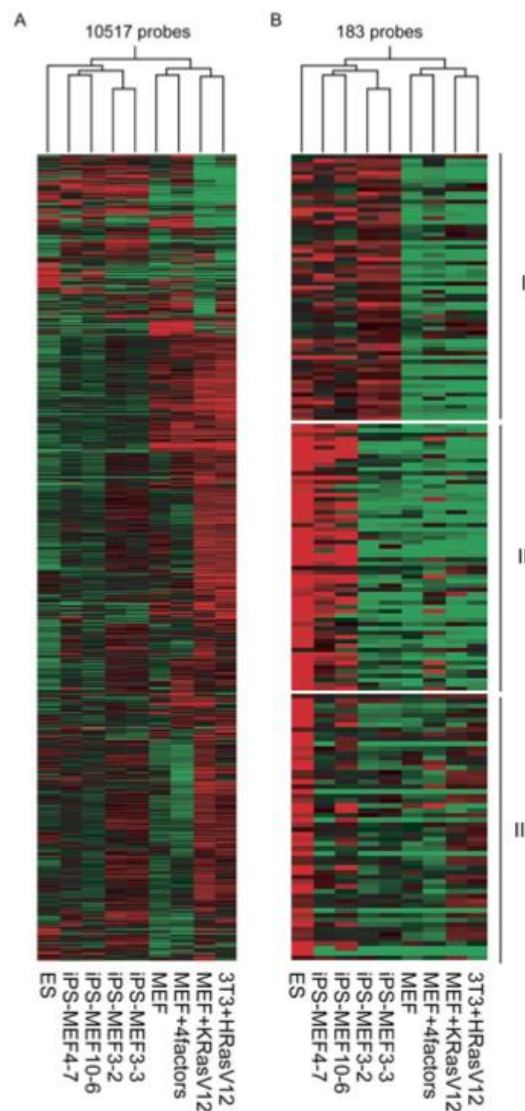


Figura 5. Análisis de la expresión genética global por microarreglos de DNA. En la imagen A se muestra la correlación de Pearson de 10,517 pruebas en células madre

embrionarias, células iPS (MEF4, MEF10, MEF3 y MEF), células MEFs expresando los cuatro factores, la expresión de K-RasV12 de MEFs inmortalizadas y células NIH 3T3 transformadas por H-RasV12. El color rojo muestra un aumento en la expresión comparado con niveles medios de ocho muestras, mientras que el color verde indica una disminución en la expresión. Estos análisis demostraron que, por la similitud a primera vista de los patrones de coloración, las células iPS están agrupadas cerca de las células madre embrionarias pero separadas de los fibroblastos. Por otro lado, en la imagen **B** se muestran a los genes que de manera común se regulan en las células madre embrionarias y en las células iPS. En la agrupación I se muestran a los genes regulados por ambos grupos celulares; en la agrupación II están los genes más regulados en las células madre embrionarias y en las iPS-MEF4, -MEF10 y MEF3; los genes del grupo III están más regulados en las células madre embrionarias que en las células iPS. En general, estos datos demuestran que las iPS son similares pero no idénticas a las células madre embrionarias.

15. La mayoría, pero no todos los clones de iPS-MEF10 e iPS-MEF4, exhiben pluripotencia.
16. A pesar de que los tres factores (*Oct3/4*, *c-Myc* y *Klf4*) pueden inducir la expresión de algunos genes marcadores de células madre embrionarias, no fueron capaces de inducir pluripotencia.
17. Las células iPS-MEF10, iPS-MEF4 e iPS-MEF3 formaron cuerpos embrioides en platos de plástico sin tapa. Cuando se crecieron en platos de tejido, los cuerpos embrioides de las células iPS-MEF10 e iPS-MEF4 se unieron al fondo del plato y comenzaron la diferenciación. Los cuerpos embrioides de las células iPS-MEF3 se mantuvieron indiferenciadas incluso cuando se cultivaron en platos con gelatina. Estos datos confirman que la pluripotencia de las células iPS-MEF10 y de las células iPS-MEF4 pero la nulipotencia de las iPS-MEF3 *in vitro* (Fig. 6).

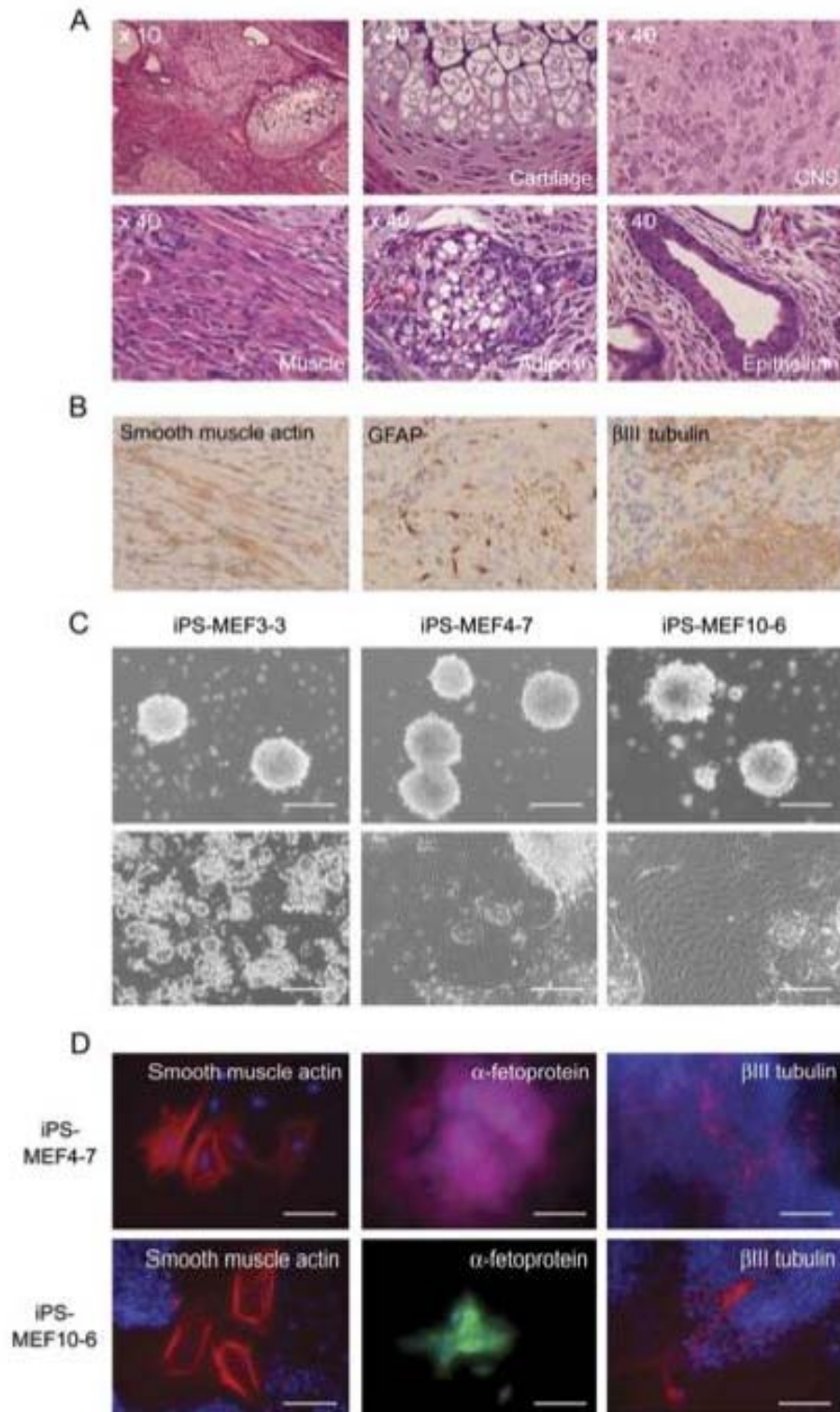


Figura 6. Pluripotencia de células iPS derivadas de MEFs. En la imagen **A** se muestran tejidos encontrados en los teratomas derivados de iPS-MEF4, como es músculo, epitelio o cartílago, demostrando la formación de tejidos de las tres capas

germinales. En la imagen **B** se muestran a los tejidos con análisis inmunológicos que confirman la diferenciación hacia tejidos neuronales y músculo en los teratomas, derivados de la misma colonia que en la imagen A. En la imagen **C** se observa la formación y diferenciación *in vitro* de cuerpos embrioides, los cuales se mantuvieron indiferenciados incluso cuando fueron cultivados en platos recubiertos. Finalmente, en la imagen **D** se muestran los análisis inmunológicos que confirman la diferenciación *in vitro* de las tres capas germinales provenientes de las iPS-MEF4 y –MEF10.

18. Se obtuvieron 3 colonias resistentes a G418, de las cuales se pudieron establecer las células iPS.
19. La RT-PCR mostró que los clones 3 y 7 de iPS-TTFgfp4 expresaron la mayoría de los genes marcadores de células madre embrionarias a niveles altos y los otros a niveles más bajos (Fig. 7A) . La RT-PCR mostró que las células iPS-TTFgfp4wt expresaron la mayoría de los genes marcadores de células madre embrionarias (Fig. 7B). Además, las células iPS-TTFgfp4 se pudieron diferenciar a todas las tres capas germinales *in vitro*. Estos datos demostraron que los cuatro factores seleccionados podían inducir células pluripotentes a partir de cultivos de fibroblastos de ratón (Fig. 7C).

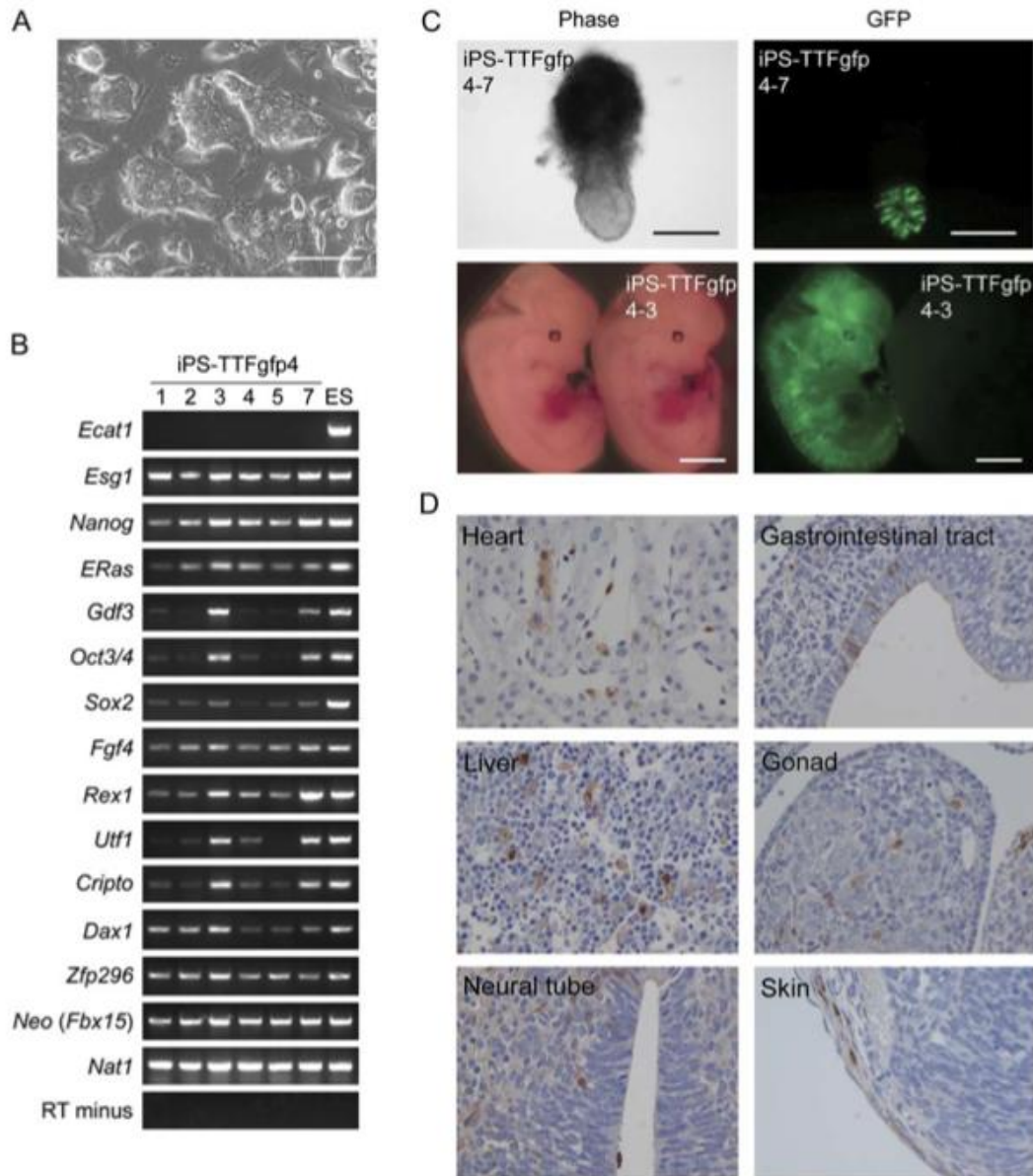
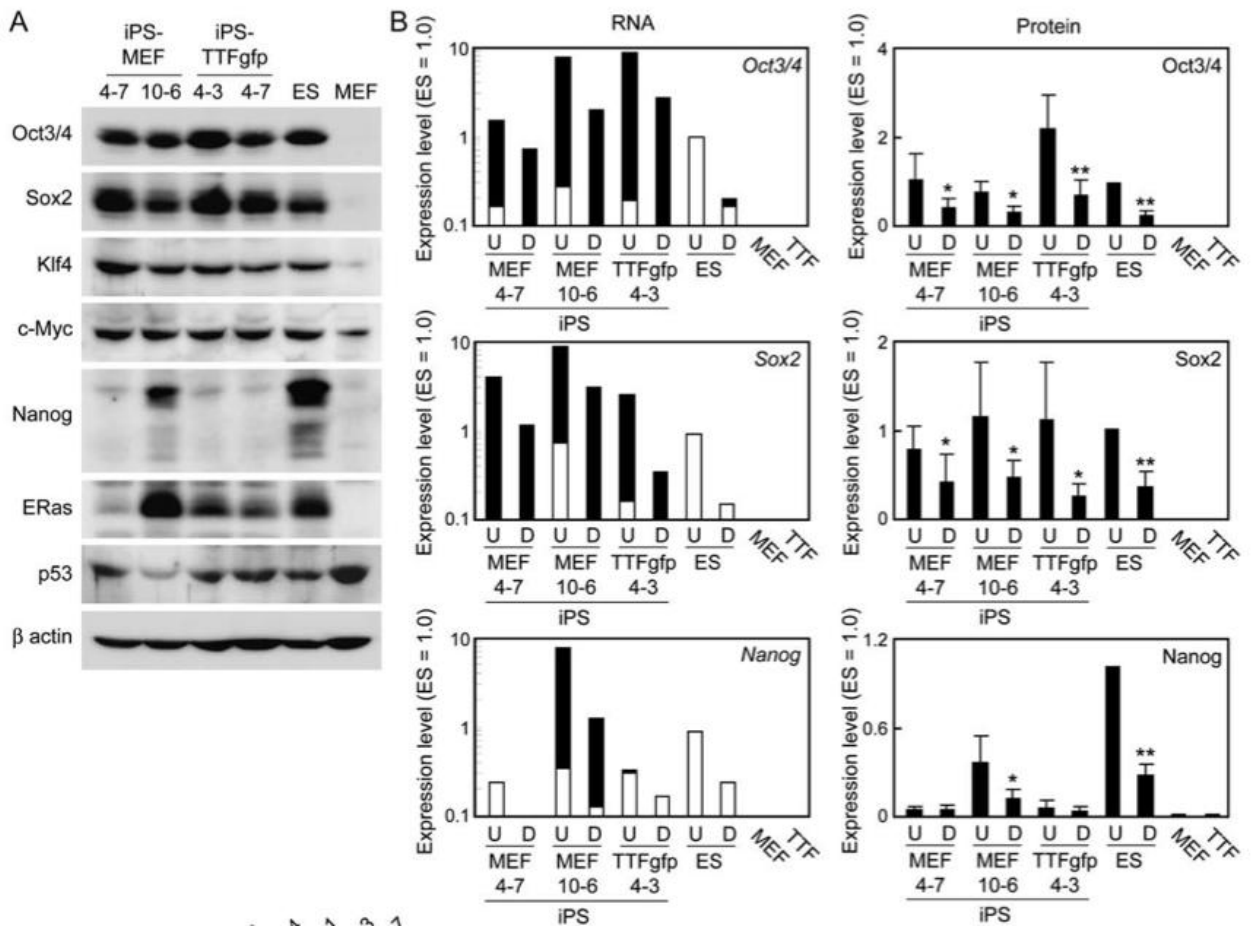


Figura 7. Caracterización de células iPS derivadas de fibroblastos de adulto de ratón. En **A** se observa la morfología de las iPS-TTFgfp4-2, las cuales son indistinguibles de las células madre embrionarias. En **B** se muestra el análisis por RT-PCR de la expresión de genes marcadores para células madre embrionarias en las células iPS-TTFgfp4. Se observa la presencia de la mayoría de los genes marcadores de células madre embrionarias a niveles altos, mientras que los que no lo son están a niveles bajos. En la imagen **C** se observa la contribución de las iPS-TTFgfp4 al desarrollo embrionario de ratón, en tanto que esas líneas celulares fueron inyectadas a los blastocistos. Los resultados son la obtención de células que mostraban las proteínas GFP. Por último, el

embrión quimérico E13.5 fue seccionado y tratado con análisis inmunológicos. Un análisis histológico con GFP y eosina, confirmó que las células formaban parte de las tres capas germinales.

20. Por PCR de tiempo real se confirmó que la expresión endógena de *Oct3/4* y *Sox2* fue menor en las células iPS que en las células madre embrionarias (Fig. 8A y B).

21. Los análisis de southern blot mostraron que cada clon de células iPS tiene un patrón único de integración de transgen (Fig. 8C). Estos resultados, junto con los diferentes patrones de expresión, excluyen la posibilidad de que las células iPS sean resultado de contaminación de células madre embrionarias preexistentes. Finalmente, los subclones de las células iPS fueron positivos para la fosfatasa alcalina y se pudieron diferenciar en las tres capas germinales *in vitro*, confirmando su naturaleza clonal.



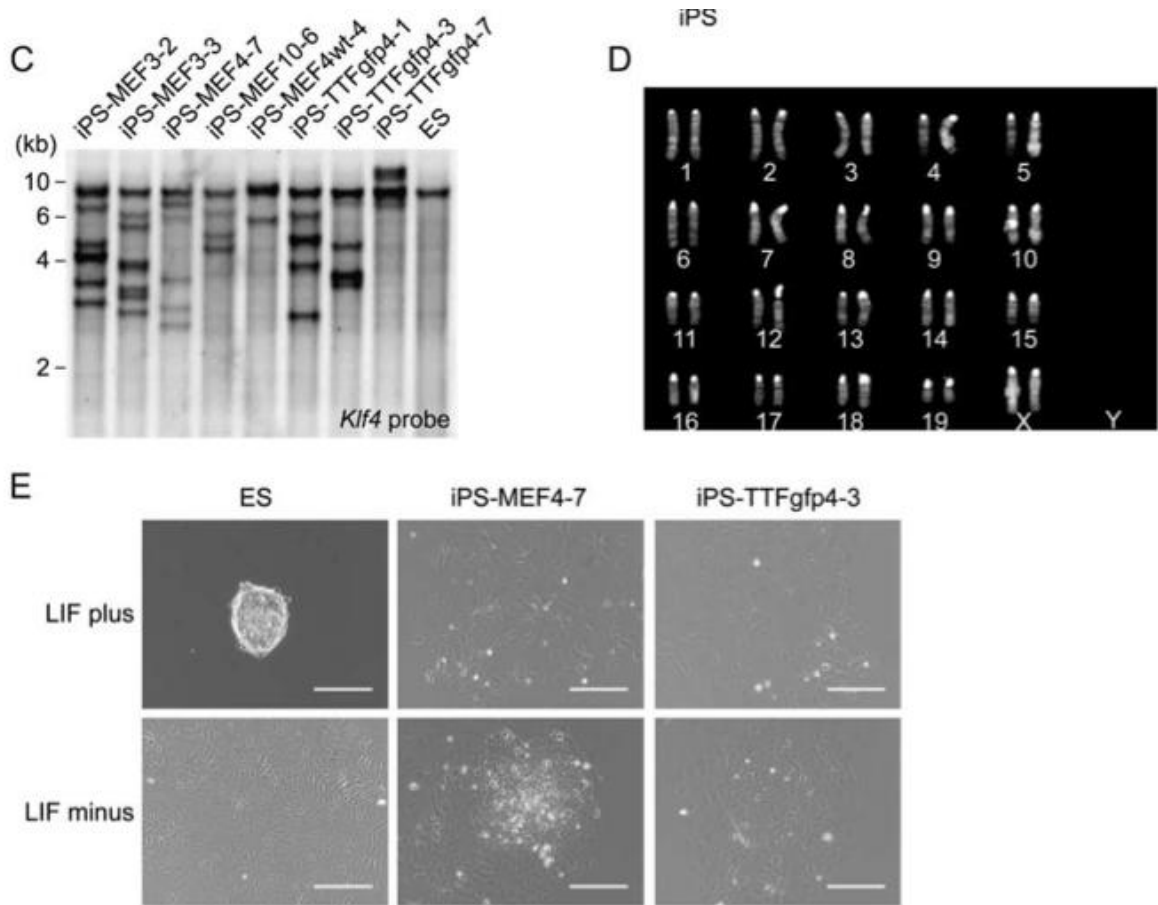


Figura 8. Análisis bioquímicos y genéticos de células iPS. En la imagen **A** se observan análisis de western blot de los cuatro factores junto con otras proteínas en las células iPS (MEF4-7, MEF106, TTFgfp4-3 y TTFgfp4-7), en células madre embrionarias y en células MEF. Esto demostró que las cantidades totales de proteína de los cuatro factores era comparable a los vistos en células madre embrionarias. Se vio que los niveles de *Nanog* y de E-Ras en las células iPS era menor a los vistos en las células madre embrionarias. Los niveles de p53 eran menores en las células iPS que en las células MEF o en las células madre embrionarias. En la imagen **B** se observan cambios en los niveles de RNA (izquierda) y en los de las proteínas (derecha) de *Oct3/4*, *Sox2*, y *Nanog* en las células iPS, y en las células madre embrionarias. La cantidad total de expresión mRNA de *Oct3/4*, y *Sox2* disminuyó pero se mantuvo más alto que en las células madre embrionarias. Por otro lado, sus niveles de proteínas disminuyeron a comparación de las células iPS y de las células madre embrionarias. El southern blot que se muestra en la imagen **C** indica que cada clon de células iPS tiene un patrón de integración único para cada transgen. La imagen **D** muestra el cariotipo normal de los clones de iPS- TTFgfp4. Finalmente, en la imagen **E** se ve la morfología de las células

madre embrionarias y de las células iPS cultivadas sin células que las alimenten. Esto demuestra que las células iPS pueden no mantenerse indiferenciadas cuando son cultivadas en la ausencia de células que las alimentan.

Resultados de inducción de células humanas

1. En células MEF, más del 80% expresaron GFP. Menos del 20% de las HDF expresaron GFP con menos intensidad que en las células MEF.
2. La introducción de un receptor de retrovirus, el Slc7a1, produjo una eficiencia de la transducción del 60%, con una intensidad similar a la de las células MEF.
3. Dos semanas después de introducir el retrovirus con los cuatro factores *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-Myc* en HDF-Slc7a1, aparecieron algunas colonias granuladas y no eran similares a las células madre embrionarias humanas en morfología (Fig. 9C). En el día 25, observaron distintos tipos de colonias que eran aplanadas y se asemejaban en morfología a las colonias de células madre embrionarias humanas (Fig. 9D), como en un gran núcleo, poco citoplasma o dependencia alimenticia. Por estas similitudes, las células seleccionadas después de la transducción de HDF fueron llamadas *células iPS humanas* (Fig. 9F).

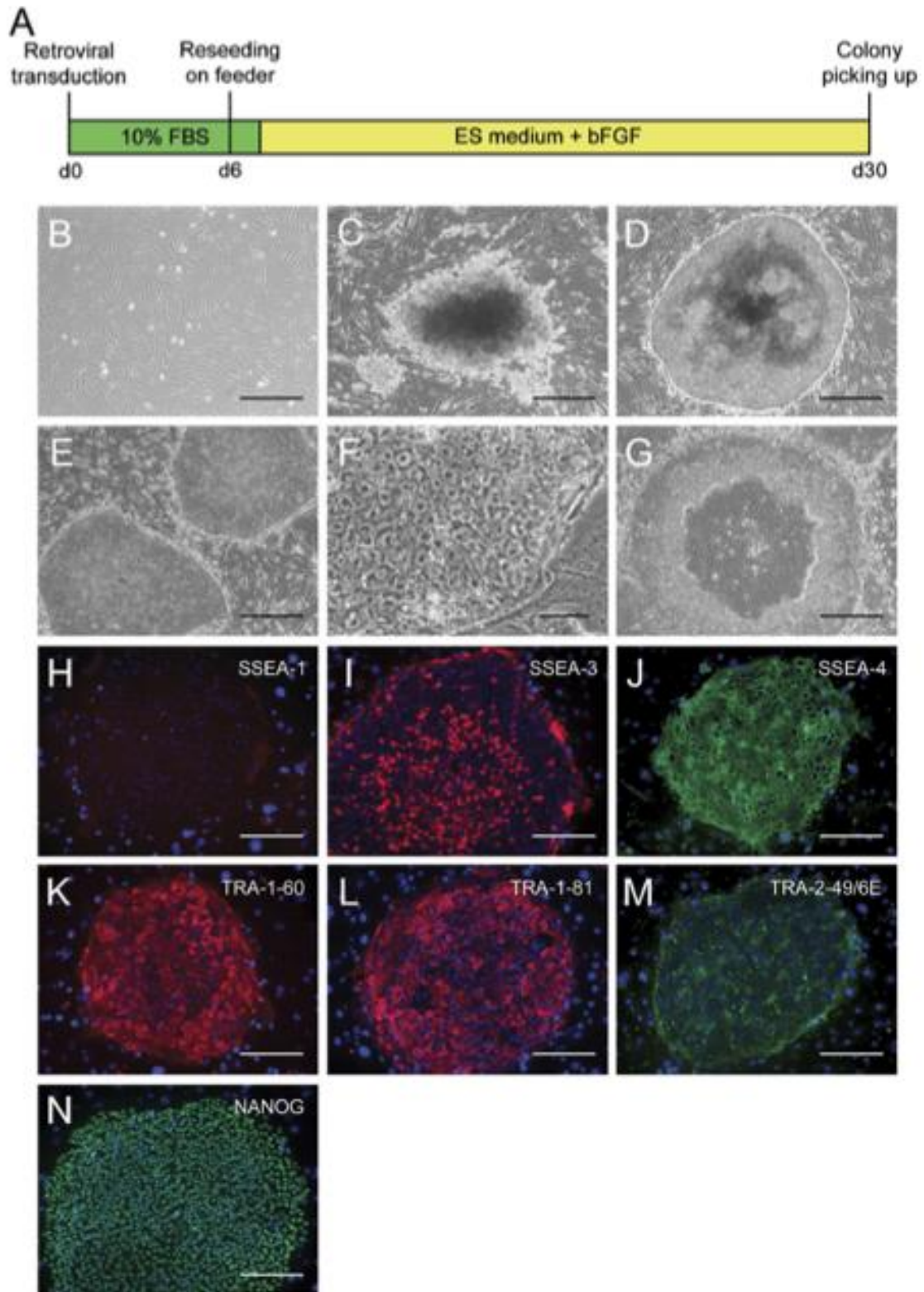


Figura 9. Inducción de células iPS a partir de HDF adultos. En la figura A se esquematiza el calendario de la generación de células iPS, el cual comienza con la

inyección del retrovirus y termina con la colecta celular. La imagen **B** muestra la morfología de la HDF (*Human Dermal Fibroblast*), a la que se le introdujeron los factores *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-Myc*. Mientras que en la imagen **C** se observa la morfología de una colonia de células que no son similares a las de una célula madre embrionaria, en la imagen **D** se observa la morfología de una colonia de células madre embrionarias, las cuales son aplanadas. Ya en la imagen **E** se puede ver una morfología establecida para las células iPS, las cuales formaron agrupaciones aplanadas de células. Cada célula observada en la imagen **F** mostró una morfología similar a la de células madre embrionarias humanas, caracterizadas por un gran núcleo y citoplasma escaso. La imagen **F** contiene células iPS magnificadas mientras que la **G** presenta células que se diferenciaron de manera espontánea en el centro de las colonias de células iPS. De la imagen **H** a la **N** se observan los análisis de inmunohistoquímica de SSEA-1 (**H**) el cual no se expresó en las células iPS, SSEA-3 (**I**), SSEA-4 (**J**), TRA-1-60 (**K**), TRA-1-81 (**L**), TRA-2-49/6E (**M**), y *Nanog* (**N**). De la I a la N se presentaron todos estos antígenos en la superficie celular.

4. En general, excepto por algunas células a la orilla de la colonia, las células iPS humanas no expresaron el antígeno embrionario (SSEA)-1 (Fig. 9H). En contraste, expresaron antígenos específicos de superficie de células madre embrionarias humanas, como SSEA-3 (Fig. 9I), SSEA-4 (Fig. 9J), antígeno relacionado con tumores (TRA)-1-60 (Fig. 9K), TRA-1-81 (Fig. 9L) y TRA-2-49/6E (fosfatasa alcalina), y la proteína NANOG (Fig. 9N).
5. El análisis de expresión por RT-PCR mostró que las células iPS humanas expresan muchos genes marcadores de células madre embrionarias (Fig. 10A), como *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, factor de crecimiento y diferenciación 3 (GDF3), expresión reducida 1 (REX1), factor de crecimiento de fibroblasto 4 (FGF4), gen de específico de células embrionarias 1 (ESG1), asociado de pluripotencia del desarrollo 2 (DPPA, 2), DPPA4, y telomerasa con transcriptasa reversa (hTERT), a niveles equivalentes o más altos que aquellos en las células madre embrionarias humanas en la línea celular H9 y en la línea celular de carcinoma embrionario humano, NTERA-2.

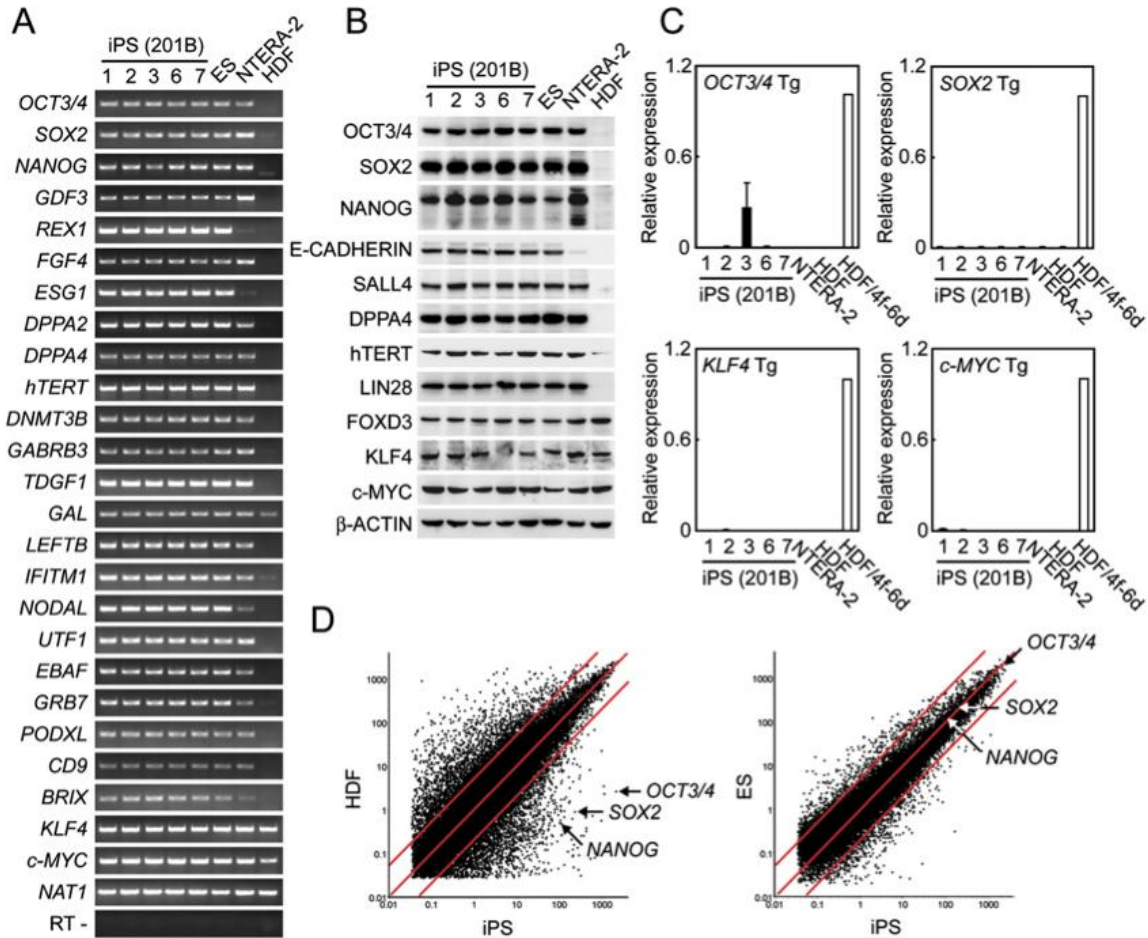


Figura 10. Expresión de los genes marcadores de células madre embrionarias humanas en células iPS humanas. En la imagen **A** se puede observar el análisis de los genes marcadores de células madre embrionarias por RT-PCR. Los primers usados para *OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-Myc*, detectaron los transcritos de genes endógenos pero no de transgenes retrovirales. **B** corresponde a un análisis por western blot de los genes marcadores de células madre embrionarias. En **C** se muestra una PCR cuantitativa para la expresión de transgenes retrovirales en células iPS, HDF y HDF 6 días después de la transducción con cuatro retrovirus, y confirma la eficiencia del silenciamiento de los cuatro retrovirus. En **D** se muestra una comparación de la expresión global de los patrones genéticos entre las células humanas iPS y las HDF, y entre las células humanas iPS y las células madre embrionarias humanas. Las flechas indican los niveles de expresión de *NANOG*, *OCT3/4* endógeno y *SOX2* endógeno. Las líneas rojas indican la diagonal y los cambios de 5 veces entre las dos muestras. Todo esto muestra que los patrones de expresión global de los genes es similar pero no idéntico, entre las células iPS y las células madre embrionarias humanas.

6. Por western blot, el nivel de las proteínas como *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *SALL4*, *E-CADHERIN*, y *hTERT*, fueron similares a las células iPS humanas y a las células madre embrionarias humanas (Fig. 10B). A pesar de que los niveles de expresión de *KLF4* y *c-Myc*, aumentó más de 5 veces en HDF después de la transducción retroviral, los niveles de expresión en células iPS humanas era comparable a aquellos de HDF, indicando silenciamiento retroviral (Fig. 10D).
7. Los análisis de secuenciación de bisulfito, que evaluaron el estado de metilación de las islas CpG en el promotor de genes como *OCT3/4*, *REX1*, y *NANOG*, revelaron que estaban altamente desmetilados, mientras que las islas CpG de las regiones de HDFs estaban altamente metiladas. Estos resultados indicaron que estos promotores están activos en las células iPS humanas (Fig. 11A).
8. Ensayos con luciferasa mostraron que los promotores *OCT3/4* y *REX1*, tenían altos niveles de actividad transcripcional en células iPS y en células embrionarias derivadas de teratocarcinoma (Fig. 11B).
9. Los análisis de inmunoprecipitación de cromatina para analizar las modificaciones de histonas en células iPS humanas, mostraron que la lisina 4 de la histona H3 estaba metilada, mientras que la lisina 27 de la H3 estaba desmetilada en los promotores de *OCT3/4*, *SOX2*, y *NANOG*. También se encontraron patrones bivalentes de los genes asociados con el desarrollo, como *MSX2*, *PAX6* y *HAND1* (Fig. 11C).

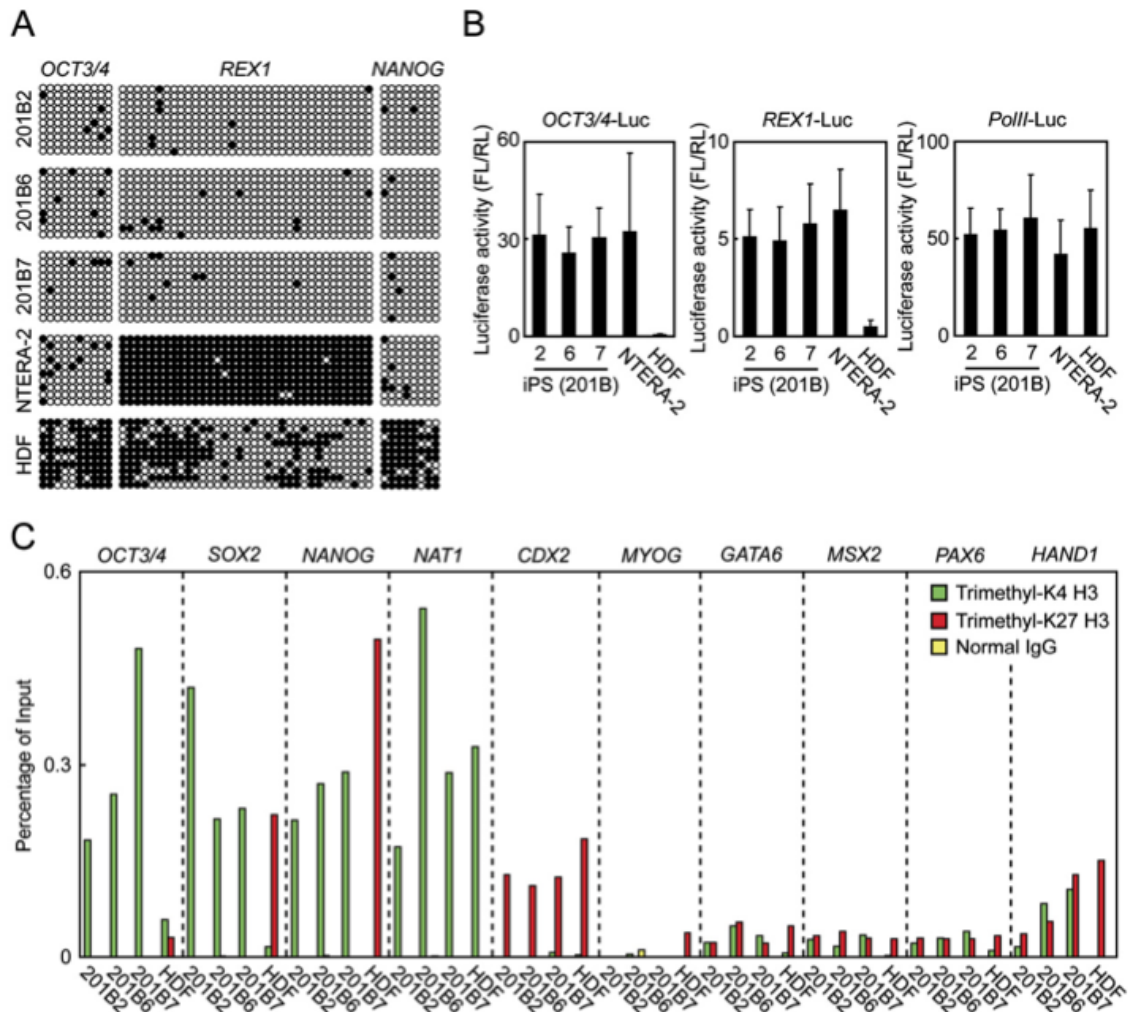


Figura 11. Análisis de los promotores de los genes asociados al desarrollo en células iPS humanas. El análisis por secuenciación de bisulfito de los promotores de *OCT3/4*, *REX1*, y *NANOG* de la imagen **A** mostró que están altamente desmetilados, mientras que las islas CpG de las HDF están altamente metiladas. Esto indica que los promotores están activos en las células iPS humanas. En la imagen **B** se observan ensayos de luciferasa, y las gráficas muestran el promedio de los resultados por ensayo. Estos resultados muestran que los promotores tienen una alta actividad transcripcional en células iPS y embrionarias derivadas de teratocarcinoma. Por último, la imagen **C** muestra la inmunoprecipitación de cromatina de la lisina 4 y lisina 27 de la histona H3. Se encontró que la lisina 4 de la histona H3 estaba metilada, mientras que la lisina 27 de la H3 estaba desmetilada en los promotores de *OCT3/4*, *SOX2*, y *NANOG*. También se encontraron patrones bivalentes de los genes asociados con el desarrollo, como *MSX2*, *PAX6* y *HAND1*.

10. Las células iPS humanas mostraron una alta actividad de telomerasa (Fig. 12A).

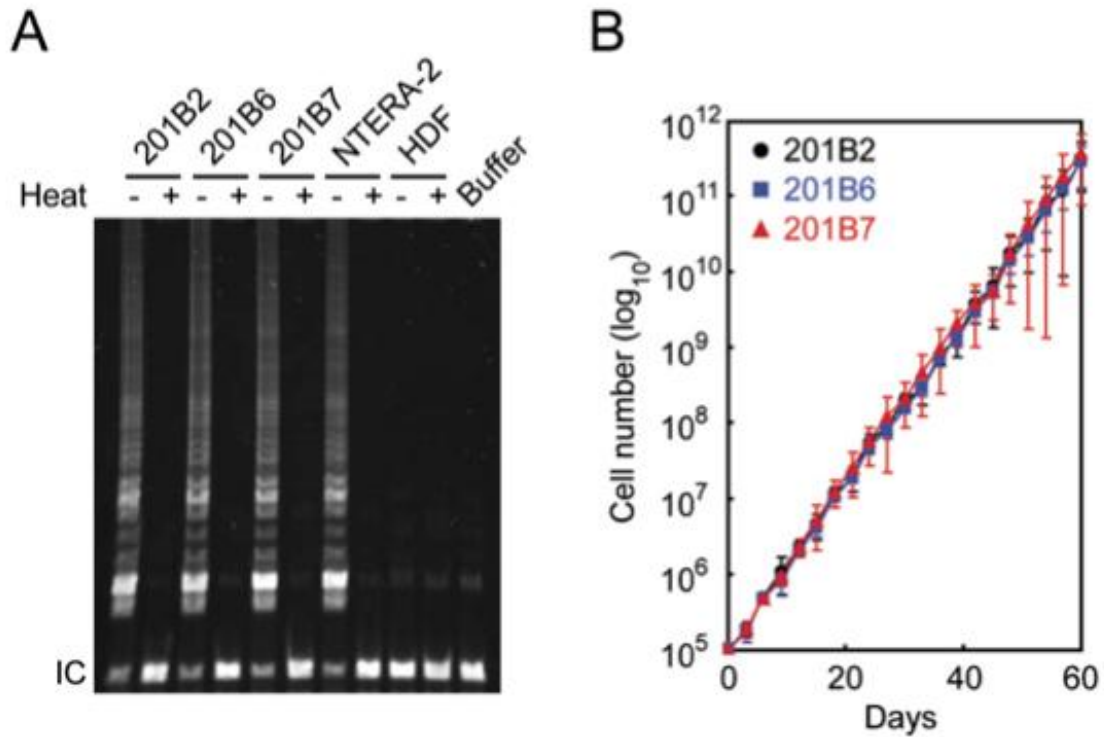


Figura 12. Altos niveles de actividad de telomerasa y proliferación exponencial de células iPS humanas. En la imagen A se observa la detección de actividad de la telomerasa por el método de TRAP. La gráfica de la imagen B muestra la curva de crecimiento de las células iPS, donde se ve que proliferaron exponencialmente por cuatro meses.

11. Para determinar la habilidad de diferenciación en las células iPS humanas, se utilizaron cultivos flotantes de cuerpos embrioides (EBs) (Fig. 13A). Las células unidas mostraron diferentes tipos de morfologías, como neuronales (Fig. 13C) o epiteliales (Fig. 13D). La inmunquímica detectó células positivas para β III-tubulina (un marcador del ectodermo) (Fig. 13J), GFAP (ectodermo) (Fig. 13K), desmina (mesodermo) (Fig. 13I), vimentina (mesodermo y endodermo parietal). La RT-PCR confirmó que estas células diferenciadas expresaron *FOXA2* (endodermo), *AFP* (endodermo), citoqueratina 8 y 18 (endodermo), *SOX17* (endodermo),

brachyury (mesodermo), *MSX1* (mesodermo), *MAP2* (ectodermo), *PAX6* (ectodermo). En contraste, la expresión de *OCT3/4*, *SOX2* y *NANOG*, disminuyó. Esto demuestra que las células iPS se pueden diferenciar en las tres capas germinales *in vitro*.

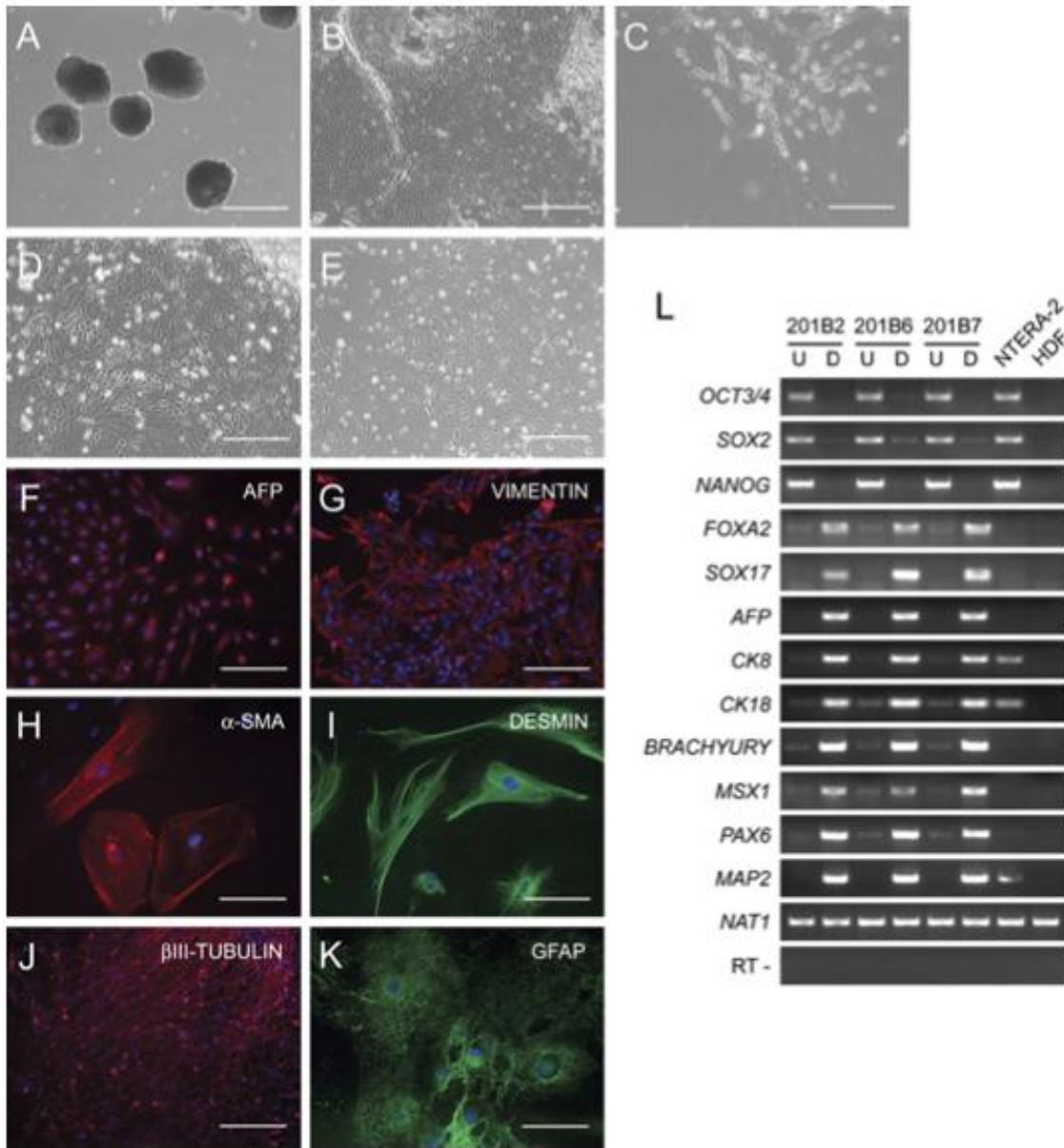


Figura 13. Diferenciación embrioide mediada por el cuerpo de las células iPS. La imagen **A** muestra el cultivo flotante de células iPS en el día 8, las cuales tenían forma de pelota. De la imagen **B** a la **E** se muestran células diferenciadas con distintas morfologías en el día 16, ya que en la **C** se ven células similares a neurona, en la **D** se observan células epiteliales y en la **E** se muestran células similares a hematopoiéticas. De la

imagen **F** a la **K** se muestran inmunoquímicas de alfa-fetoproteína en **F**, vimentina en **G**, actina de músculo liso en **H**, desmina en **I**, betalIII tubulina en **J**, y GFAP en **K**. Finalmente en **L** se muestran los análisis de la expresión por medio de RT-PCR de diferentes marcadores de las tres capas germinales. Estos resultados muestran que las células iPS se pueden transformar en las tres capas germinales *in vitro*.

12. Con la examinación de la diferenciación podía ser inducida por métodos reporteros, las células se dispersaron drásticamente, y algunas estructuras neuronales fueron observadas (Fig. 14A). El análisis por PCR demostró la expresión de marcadores de neuronas dopaminérgicas (Fig. 14C). La expresión de GFAP no fue inducido con este sistema. Por otro lado, la expresión de *OCT3/4* y *NANOG* disminuyó considerablemente. Estos datos demostraron que las células iPS se pueden diferenciar en células neuronales, incluyendo en dopaminérgicas, por el cocultivo con las células PA6.

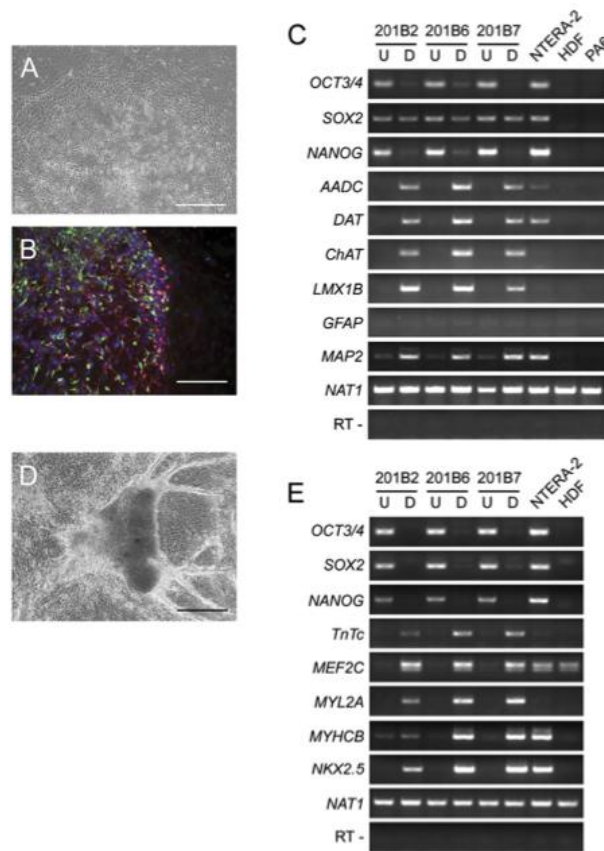


Figura 14. Diferenciación directa de células iPS humanas. En **A** se muestra una imagen por fase de contraste de células iPS diferenciadas después de 18 días de cultivo.

Las células se dispersaron drásticamente, y se observaron algunas estructuras neuronales. En **B** se muestra la inmunocitoquímica de las células mostradas en A, con el anticuerpo alfaIII tubulina en rojo y el anticuerpo tirosina hidroxilasa en verde. Se encontraron células positivas para tirosina hidroxilasa y betaIII tubulina. En **C** se muestran los análisis RT-PCR de marcadores de neuronas dopaminérgicas. Además, la expresión de *OCT3/4*, y *NANOG* disminuyó marcadamente, mientras que *SOX2* disminuyó muy poco. **D** muestra una imagen de fase de contraste de las células iPS diferenciadas en cardiomiocitos. Finalmente, en **E** se observan análisis RT-PCR de marcadores de cardiomiocitos.

13. Doce días después de la diferenciación directa cardíaca de células iPS humanas, empezaron a latir. El RT-PCR mostró que estas células expresaron marcadores de cardiomiocito (Fig. 14E). La expresión de *OCT3/4*, *SOC2* y *NANOG* disminuyó. Estos datos mostraron que las células iPS humanas pueden diferenciarse en miocitos cardíacos *in vitro* (Fig. 14D).
14. Se observó la formación de un tumor para probar la pluripotencia *in vivo*. La examinación histológica mostró que el tumor contenía diferentes tejidos, como músculo estriado (mesodermo), cartílago (mesodermo), tejido neuronal (ectodermo), entre otros (Fig. 15).

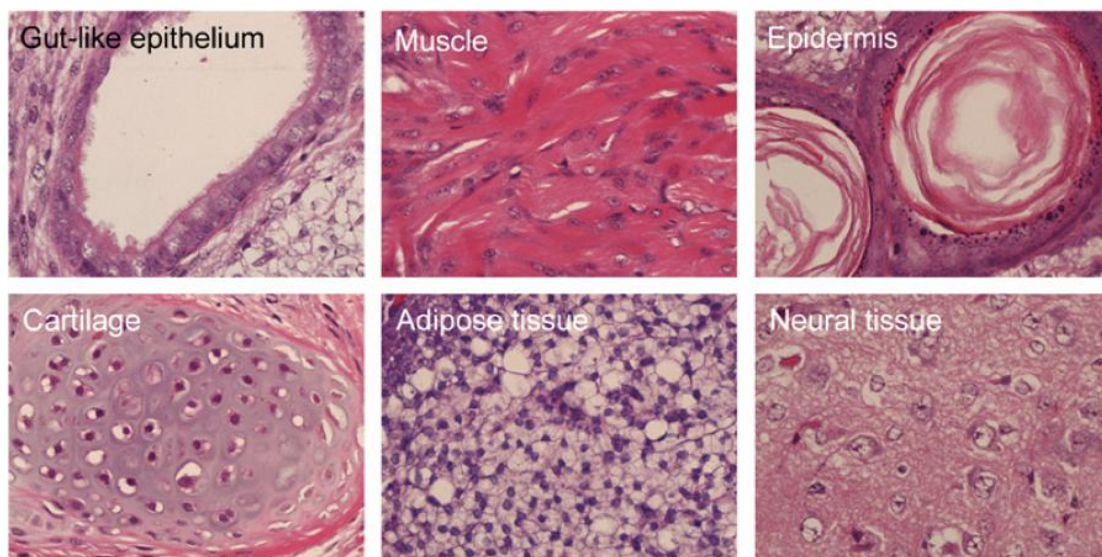


Figura 15. Células iPS humanas derivan de HDF, no por contaminación cruzada

La imagen muestra la tinción por hematoxilina y eosina del teratoma derivado de células iPS. Las células fueron trasplantadas subcutáneamente en cuatro partes a ratones

inmunodeficientes. El tumor se formó en el lugar de la inyección. La examinación histológica mostró que el tumor contenía diferentes tejidos de las tres capas germinales.

15. La PCR del DNA de células humanas iPS, mostró que todos los clones tienen integración de los cuatro retrovirus. El análisis de southern blot con cDNA de c-Myc reveló que cada clon tiene un patrón único de sitios de integración retroviral. Los clones de iPS derivaron de HDF y no fueron resultado de una contaminación cruzada.

16. Se generaron células iPS a partir de otras células somáticas humanas.

Yamanaka menciona en su artículo del 2012 (Watanabe, A., *et al.* 2012) sobre la regulación epigenética en células madre embrionarias, que hasta ese momento las iPS se habían podido generar a partir de muchos tipos celulares, como los queratinocitos, mucosa oral, sangre periférica, entre otros. Menciona que las características de las células totalmente reprogramadas son muy similares a nivel funcional y molecular a las células madre embrionarias, en términos de morfología, expresión genética y capacidad para diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales.

3.2 Interpretación de resultados

A continuación se interpretarán cada uno de los resultados obtenidos en ambos artículos. En este apartado se mencionarán las preguntas que surgieron y cómo fueron respondidas con los experimentos. Se hablará de las técnicas y la razón por la que fueron empleadas. Cada resultado generó nuevas preguntas, por lo que se hilarán los resultados, que en general resultaron en la generación de células iPS.

Interpretación de resultados de inducción de células de ratón

1. Las células madre embrionarias homócigas con la construcción de β_{geo} ($Fbx15^{\beta_{geo}/\beta_{geo}}$) fueron resistentes a concentraciones extremadamente altas de G418 (arriba de 12 mg/ml) mientras que las células somáticas de ratón derivadas de $Fbx15^{\beta_{geo}/\beta_{geo}}$ fueron sensibles a concentraciones normales de G418.

Posterior a la selección de 24 genes como candidatos que inducen la pluripotencia en células somáticas, los investigadores desarrollaron un método, en el que al insertar un vector en el gen *Fbx15*, las células pluripotentes fueran resistentes al polipéptido G418. Ser resistente a este polipéptido significa que la elongación no se inhibe, por lo que la síntesis de proteínas no se detiene. Esto es lógico si se entiende que *Fbx15* es una proteína que se expresa en células madre embrionarias, por lo que si las células son resistentes a G418, *Fbx15* sí se expresaría. Por tal motivo, obtuvieron que las células madre embrionarias homocigas para β geo fueran resistentes a altas concentraciones del polipéptido, funcionando así como control, mientras que las somáticas derivadas modificadas fueron sensibles a concentraciones normales.

2. No se obtuvieron colonias resistentes al fármaco con un factor único (de los 24), lo que indica que un gen único no era suficiente para activar el locus *Fbx15*.

Una vez seleccionados los 24 factores y probado el método, se recurrió a probar cada uno de los factores en colonias únicas. El resultado obtenido fue que ninguno de ellos logró ser resistente al fármaco, es decir, ninguno activó el locus *Fbx15* específico de pluripotencia y resistencia a G418. Esto hizo comprobar lo que sucedería después de utilizar los 24 factores juntos.

3. La transducción de los 24 candidatos juntos generó 22 colonias resistentes a G418. De los 12 clones que se continuaron cultivando bajo la selección, 5 exhibieron morfología similar a las células madre embrionarias, incluyendo una forma redondeada, un nucléolo largo y un citoplasma escaso.

La presencia de los 24 factores juntos dieron colonias resistentes al polipéptido, lo que significó que era la combinación de algunos factores era lo que generaba la resistencia. La continuación y la repetición del cultivo permitió reducir el número de células a estudiar; la segunda vez se obtuvieron 29 colonias, de las que se escogieron 6 para trabajar. De los 6 clones, cuatro presentaron características propias de células madre embrionarias. La siguiente pregunta a responder era si además de características morfológicas que presentaron, éstos tenían genes específicos de células madre embrionarias.

4. Los análisis de la expresión por medio de RT-PCR revelaron que los clones iPS-MEF24 expresaban marcadores de células madre embrionarias, incluyendo *Oct3/4*, *Nanog*, *E-Ras*, *Cripto*, *Dax1*, *Zfp296* y *Fgf4*.

Para determinar los factores presentes en los clones y que son característicos en una célula madre embrionaria, se recurrió a una RT-PCR. La PCR en tiempo real, es una técnica que amplifica, detecta y cuantifica moléculas blanco de cDNA. Por tanto, la técnica permitió cuantificar las moléculas de cada factor presentes en estos clones, llegando a la conclusión de que se contaba con moléculas específicas de células madre embrionarias. La siguiente pregunta a contestar era el estado epigenético de promotores en células diferenciadas y células madre embrionarias, como es *Fbx15*, *Oct3/4* y *Nanog*.

5. La secuenciación genómica por bisulfito demostró que los promotores de *Fbx15* y *Nanog* estaban desmetilados en las células iPS. En contraste, el promotor *Oct3/4* se mantuvo metilado en estas células. Estos datos indicaron que alguna combinación de estos 24 factores candidatos induce la expresión de los genes marcadores de células madre embrionarias en cultivo de MEF.

Los promotores de *Fbx15* y *Nanog* se encontraron desmetilados en las células inducidas (iPS, que fueron nombradas así desde la obtención de los clones) y en las madre embrionarias, pero metilados en las células MEF. Esto es entendible si se toma en cuenta que muchos promotores encargados de proliferación y mantenimiento de la pluripotencia, como es el caso de *Fbx15* y *Nanog*, se encuentran metilados en las células diferenciadas dado que esta condición es innecesaria. En cambio, se encuentran desmetilados en células iPS y células madre embrionarias por sus características propias. Sin embargo, *Oct3/4* de encontró metilado tanto en las células iPS como en las MEF, pero desmetilado en la células madre embrionarias, lo que hizo pensar a los investigadores que la combinación de algunos factores era lo que debía inducir a las células a modificar su estado, pues como vimos, *Oct3/4* está asociado con indiferenciación, por lo que se debió haber encontrado desmetilado como *Fbx15* y *Nanog*. Este fue el experimento clave que permitió a los investigadores hipotetizar sobre la combinación de algunos factores, y no de la necesidad de los 24.

6. Identificaron 10 factores, pues de su eliminación del grupo de transducción resultó en la nula formación de colonias, 16 días después de la transducción. La combinación de estos 10 genes produjo más colonias parecidas a células madre embrionarias que la transducción de los 24 genes juntos hizo.

Para llegar a esto, los investigadores fueron eliminando factores individuales de las colonias. Esto permitió llegar a 10 factores ya que al momento de eliminarlos, las colonias no se formaban, por la misma razón que en el primer experimento. Para confirmar que estos diez factores eran suficientes, los investigadores generaron clones con esos 10 factores y obtuvieron más colonias de células iPS que las que obtuvieron con los 24 factores. Una vez obtenidos los clones con 10 factores, se eliminó individualmente cada factor con la intención de saber si existían aún menos factores que indujeran la transformación de las células.

7. Las colonias resistentes a G418 no se formaron cuando *Oct3/4* o *Klf4* fueron removidos. La remoción de *Sox2* resultó en la formación de sólo algunas colonias resistentes a G418. Cuando se removió *c-Myc*, las colonias resistentes a G418 emergieron pero tenían una morfología aplanada, no característica de las células madre embrionarias. La remoción de los factores remanentes no afectó de manera significativa el número de colonias. Estos resultados indicaron que *Oct3/4*, *Klf4*, *Sox2* y *c-Myc* juegan un papel importante en la generación de células iPS a partir de MEF.

Una vez eliminado individualmente cada factor, se encontró que *Oct3/4* y *Klf4* no formaban colonias, y a pesar de que otros dos factores sí lo hacían, no presentaban la morfología de una célula madre embrionaria. Este resultado permitió comprobar que los cuatro factores eran importantes en la inducción de células. La siguiente pregunta a responder era si la combinación de los cuatro factores generaría células pluripotentes.

8. La combinación de los cuatro genes produjo un número de colonias resistentes a G418 similar al observado con la combinación de los 10 genes. Estos datos demostraron que las células iPS pueden ser inducidas a partir de cultivo MEF por la introducción de estos cuatro factores de transcripción.

Este experimento corroboró la hipótesis general de los experimentos, ya que es posible generar células pluripotentes, al menos en morfología, con algunos cuantos factores. Posteriormente, los investigadores estudiaron la combinación de los factores y cómo éstos resultarían en colonias.

9. Los resultados a continuación muestran que la combinación de *Oct3/4*, *c-Myc* y *Klf4* pueden activar el locus *Fbx15* pero el cambio inducido por estos tres factores es diferente a los vistos con iPS-MEF4 y iPS-MEF10.
- I. La combinación de dos factores no podía inducir la formación de colonias resistentes a G418. Dos combinaciones de tres factores – *Oct3/4*, *Sox2* y *c-Myc* o *Klf4*, *Sox2* y *c-Myc* – generaron una colonia pequeña en cada caso, pero no pudieron ser mantenidas en cultivo.
 - II. Con la combinación de *Oct3/4*, *Sox2* y *Klf4* se observó la formación de 36 colonias resistentes a G418, que presentaron una morfología no característica de células ES.
 - III. Con la combinación de *Oct3/4*, *c-Myc* y *Klf4* se observó la formación de 54 colonias resistentes a G418, de las que se escogieron 6. Los clones se pudieron mantener a través de algunas generaciones, la morfología de estas células (iPS-MEF3) difirieron de las iPS-MEF4 y de las iPS-MEF10, además de que presentaron una superficie rugosa.

Con estos resultados, se alcanzó el objetivo inicial del trabajo pues es posible generar células indiferenciadas a partir de la introducción de algunos factores. Al saber que en morfología se obtenían células similares a células madre embrionarias, la siguiente pregunta era saber si a nivel molecular esto también ocurría.

10. La expresión de algunos genes marcadores, incluyendo *Oct3/4*, era mayor en los clones iPS-MEF4-7, iPS-MEF 10-6 e iPS-MEF 10-7 que en el resto de los clones. *Sox2* sólo se expresó en iPS-MEF 10-6.
11. Los análisis de precipitación de la cromatina mostraron que los promotores de *Oct3/4* y *Nanog* tenían un aumento en la acetilación de la histona H3 y disminuyó la dimetilación de la lisina 9 de la histona H3.

El aumento de la acetilación en la histona 3 está asociado con un aumento en la transcripción, mientras que dimetilación de la lisina 9 está asociada con la represión de la transcripción, la disminución implicaría que la transcripción se está dando. Ambas marcas

epigenéticas son evidencia de que estos promotores están activos, característica necesaria para mantener la pluripotencia e indiferenciación.

12. Las células iPS-MEF4 y las iPSMEF10 fueron positivas para la fosfatasa alcalina y para SSEA-1, y mostraron una alta actividad de telomerasa. Esto demuestra que las células iPS-MEF4 e iPS-MEF10 son similares, pero no idénticas a las células madre embrionarias.

De acuerdo a la *Internacional Stem Cell Initiative*, estas características son propias de las células madre embrionarias en humanos. El que los investigadores las hayan encontrado en sus células inducidas habla de un parecido morfológico a las células madre embrionarias. Sin embargo, no son idénticas.

13. Las células iPS-MEF3 son sustancialmente diferentes a las iPS-MEF10 y a las iPS-MEF4.

Los clones que contenían *Ecat1*, *Esg1* y *Sox2* no se activaron. La primera es una proteína asociada a la transcripción de las células madre embrionarias; *Esg1* es el gen específico de células madre embrionarias; *Sox2* inhibe la diferenciación. *Nanog* fue inducido pero no de la misma manera que en las iPS-MEF10 y a las iPS-MEF4. *Oct3/4* fue activado a un nivel muy débil y *Fgf4*, el factor de crecimiento de fibroblasto, sí se activo de manera eficiente. Estos resultados confirman que las células que sólo contenían tres factores (*Oct3/4*, *c-Myc* y *Klf4*) son diferentes a las que contenían los 10 o 4 factores.

14. Los análisis de correlación de Pearsons revelaron que las iPS están agrupadas cerca de las células madre embrionarias pero separadas de los fibroblastos y sus derivados. Los datos confirmaron que las células iPS son similares pero no idénticas a las células madre embrionarias.

La comparación de la expresión global de las células madre embrionarias, las células iPS y células MEF demostró que las primeras son más parecidas entre ellas que a comparación con las MEF, las cuales están diferenciadas. Sin embargo, esto también demostró que las primeras dos líneas celulares no son idénticas. El color rojo muestra un aumento en la expresión mientras que el verde una reducción. Posteriormente, los investigadores quisieron probar la pluripotencia de las células en teratomas, esto es, *in vivo*.

15. La mayoría pero no todos los clones de iPS-MEF10 e iPS-MEF4 exhiben pluripotencia.

Este resultado se obtuvo a partir de la formación de teratomas. Este experimento está relacionado de alguna manera con el de M. J. Evans y M. H. Kaufman (1981), donde las células pluripotenciales se obtenían de teratocarcinomas. En este caso, las células iPS se inyectaron en los ratones para encontrar el camino que tomarían para diferenciarse. Con este experimento, los investigadores obtuvieron diferentes resultados pues se inyectaron diferentes tipos celulares, cada uno con combinaciones únicas y esto permitió observar que no todas exhiben pluripotencia en tanto que no todas daban como resultado las tres capas germinales.

16. A pesar de que los tres factores (*Oct3/4*, *c-Myc* y *Klf4*) pueden inducir la expresión de algunos genes marcadores de células madre embrionarias, no fueron capaces de inducir pluripotencia.

Este experimento demostró que, a pesar de que estas células pueden mostrar algunas características morfológicas, las MEF3 no son pluripotentes en tanto que los tumores de estas células son completamente indiferenciadas. Este resultado es congruente con el experimento anterior, donde se vio que las iPS-MEF3 son diferentes a las –MEF4 y a las –MEF10.

17. Las células iPS-MEF10, iPS-MEF4 e iPS-MEF3 formaron cuerpos embrioides en platos de plástico sin tapa. Cuando se crecieron en platos de tejido, los cuerpos embrioides de las células iPS-MEF10 e iPS-MEF4 se unieron al fondo del plato y comenzaron la diferenciación. Los cuerpos embrioides de las células iPS-MEF3 se mantuvieron indiferenciadas incluso cuando se cultivaron en platos con gelatina. Estos datos confirman que la pluripotencia de las iPS-MEF10 y de las iPS-MEF4 pero la nulipotencia de las iPS-MEF3 *in vitro*.

Una característica de células embrionarias en las primeras etapas del desarrollo es que forman agregados llamados cuerpos embrioides. El que sólo MEF10 y MEF4 se unieran al fondo y comenzaran con la diferenciación habla de que no sólo *in vivo* pueden comenzar a generar células de las tres capas germinales, sino también en cultivo. Por el contrario, las MEF3 no se diferenciaron, de forma congruente con el experimento anterior, por lo que se confirmó que esta línea celular, a pesar de presentar algunas características de células madre embrionarias, no son buenas candidatas para alguna terapia génica en el futuro.

18. Se obtuvieron 3 colonias resistentes a G418, de las cuales se pudieron establecer las células iPS.
19. RT-PCR mostró que los clones 3 y 7 de iPS-TTFgfp4 expresó la mayoría de los genes marcadores de células madre embrionarias a niveles altos y los otros a niveles más bajos. RT-PCR mostró que las células iPS-TTFgfp4wt expresaron la mayoría de los genes marcadores de células madre embrionarias. Además, las células iPS-TTFgfp4 se pudieron diferenciar a todas las tres capas germinales *in vitro*. Estos datos demostraron que los cuatro factores seleccionados podían inducir células pluripotentes a partir de cultivos de fibroblastos de ratón.

Posteriormente, los investigadores se preguntaron si las otras dos líneas celulares formarían teratomas con las tres líneas germinales. Una vez inyectadas las células en los ratones, se realizó una RT-PCR para cuantificar los factores, que demostraron genes marcadores de células madre embrionarias. Las células dieron como resultado la formación de células de las tres capas germinales, lo que mostró que las células inducidas pueden generar células diferenciadas.

20. PCR de tiempo real confirmó que la expresión endógena de *Oct3/4* y *Sox2* fue menor en las células iPS que en las células madre embrionarias.
21. Los análisis de southern blot mostraron que cada clon de iPS tiene un patrón único de integración de transgen. Estos resultados, junto con los diferentes patrones de expresión, excluyen la posibilidad de que las células iPS son resultado de contaminación de células madre embrionarias preexistentes. Finalmente, los subclones de las células iPS fue positivo para la fosfatasa alcalina y se pudieron diferenciar en las tres capas germinales *in vitro*, confirmando su naturaleza clonal.

Finalmente, los investigadores buscaron descartar que las células inducidas obtenidas no fueron contaminadas por células madre embrionarias. El western blot, utilizado para cuantificar proteínas, mostró que las cantidades proteicas en las células iPS y las células madre embrionarias eran similares. Posteriormente, el southern blot, método para detectar la presencia de una secuencia específica de DNA, demostró que las iPS tenían un patrón único de integración de los transgenes, por lo que este experimento descartó la contaminación y confirmó el trabajo del retrovirus.

Interpretación de resultados de inducción en células humanas

Una vez logrado inducir la pluripotencia en células de ratones, un año después se publicó el trabajo realizado en células humanas.

1. En MEF, más del 80% de las células expresaron GFP. Menos del 20% de las células de fibroblastos humanos HDF expresaron GFP con menos intensidad que en MEF.

Con el fin de mejorar el método del retrovirus, los investigadores agregaron la proteína verte fluorescente para hacer evidente el éxito de la introducción de la secuencia genómica por el virus. Introdujeron la proteína en las células HDF con ayuda de un retrovirus. Por otro lado, a manera de control, introdujeron la proteína en fibroblastos embrionarios de ratón. Como resultado, el 80% de las MEF expresaron GFP, mientras que el 20% de las HDF expresaron la proteína. Esto promovió buscar otro retrovirus.

2. La introducción de un receptor de retrovirus, el *Slc7a1*, produjo una eficiencia de la transducción del 60%, con una intensidad similar a la de MEF.

El resultado anterior permitió mejorar la eficiencia de la transducción al introducir el receptor del retrovirus *Slc7a1* en el lentivirus del HDF. Posteriormente volvieron a introducir la proteína en esta línea celular ya con el retrovirus nuevo y se obtuvo un aumento del 60% de eficiencia.

3. Dos semanas después de introducir el retrovirus con los cuatro factores *OCT3/4*, *KLF4*, *SOX2* y *c-Myc* en HDF-*Slc7a1*, aparecieron en el día 25 distintos tipos de colonias que eran aplanadas y se asemejaban en morfología a las colonias de células madre embrionarias humanas, como en un gran núcleo, poco citoplasma o dependencia alimenticia. Por estas similitudes, las células seleccionadas después de la transducción de HDF como células iPS humanas.

Ya conocidos los cuatro factores responsables de la inducción de pluripotencia y probado el nuevo retrovirus, lograron obtener células que en morfología eran similares a las células madre embrionarias humanas. Gracias a esto, los investigadores llamaron a estas células iPS humanas.

4. En general, excepto por algunas células a la orilla de la colonia, las células iPS humanas no expresaron el antígeno embrionario (SSEA)-1. En contraste, expresaron antígenos específicos de superficie de células madre embrionarias humanas, como

SSEA-3, SSEA-4, antígeno relacionado con tumores (TRA)-1-60, TRA-1-81 y TRA-2-49/6E (fosfatasa alcalina), y la proteína NANOG.

Tras un análisis minucioso del fenotipo de estas células inducidas, encontraron marcadores distintivos de células madre embrionarias como es el antígeno embrionario SSEA-1. Esto confirmó que, al menos morfológicamente, las células inducidas eran similares a las células madre embrionarias humanas.

5. Los análisis de expresión evaluados por medio de RT-PCR mostraron que las células iPS humanas expresan muchos genes marcadores de células madre embrionarias, como *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, factor de crecimiento y diferenciación 3 (*GDF3*), expresión reducida 1 (*REX1*), factor de crecimiento de fibroblasto 4 (*FGF4*), gen de específico de células embrionarias 1 (*ESG1*), asociado de pluripotencia del desarrollo 2 (*DPPA*, 2), *DPPA4*, y telomerasa con transcriptasa reversa (*hTERT*), a niveles equivalentes o más altos que aquellos en las células madre embrionarias humanas en la línea celular H9 y en la línea celular de carcinoma embrionario humano, NTERA-2.

Ya a un nivel molecular, el análisis de RT-PCR y por western blot se mostró que los genes y proteínas no sólo son similares en la presencia de moléculas sino en cantidad, esto entre iPS y células madre embrionarias humanas.

6. Por western blot, el nivel de las proteínas como *OCT3/4*, *SOX2*, *NANOG*, *SALL4*, *E-CADHERIN*, y *hTERT*, fueron similares a las células humanas iPS y a las células madre embrionarias humanas. A pesar de que los niveles de expresión de *KLF4* y *c-Myc*, aumentó más de 5 veces in HDF después de la transducción retroviral, los niveles de expresión en células iPS humanas eran comparables a aquellos de HDF, indicando silenciamiento retroviral.
7. Los análisis de secuenciación de bisulfito, que evaluaron el estado de metilación de las islas CpG en el promotor de genes como *OCT3/4*, *REX1*, y *NANOG*, revelaron que estaban altamente desmetilados, mientras que las islas CpG de las regiones de HDFs estaban altamente metiladas. Estos resultados indicaron que estos promotores están activos en las células humanas iPS.

Al igual que en el trabajo anterior con células de ratón, aquí se evaluó el estado de metilación de los promotores de genes esenciales para el mantenimiento de la pluripotencia

y de la indiferenciación. El que estuvieran altamente desmetilados habla de su actividad de transcripción, característico de células indiferenciadas. La metilación de las regiones CpGs en las células HDFs es de esperarse dado que los promotores de genes específicos de células madre embrionarias bajan su actividad dado que se trata de células diferenciadas.

8. Ensayos con luciferasa mostraron que los promotores *OCT3/4* y *REX1*, tenían altos niveles de actividad transcripcional en células iPS y en células derivadas de teratocarcinoma.

Este ensayo con el bioluminiscente permitió demostrar que los promotores de estos dos genes tenían una alta actividad de transcripción en ambas células. El hecho de que dos promotores específicos de células pluripotentes estén encendidos en las células inducidas habla de la modificación de éstas últimas.

9. Los análisis de inmunoprecipitación de cromatina para analizar las modificaciones de histonas en células iPS humanas, mostraron que la lisina 4 de la histona H3 estaba metilada, mientras que la lisina 27 de la H3 estaba desmetilada en los promotores de *OCT3/4*, *SOX2* y *NANOG*. También se encontraron patrones bivalentes de los genes asociados con el desarrollo, como *MSX2*, *PAX6* y *HAND1*.

Los análisis de perfiles epigenéticos de los promotores muestran el estado de éstos. A pesar de que la metilación está asociada con la represión de la transcripción, el caso de la metilación de la lisina 4 en la histona 3 es una marca de activación. La lisina 27 de la histona tres está asociada con represión de la transcripción, por tanto, el que estuviera desmetilada hablaba de una activación de este fenómeno. Por tanto, ambas marcas epigenéticas hacen referencia a un estado activo de los promotores de genes relacionados con el mantenimiento de la pluripotencia. El que se haya encontrado estados bivalentes significa que estos genes pueden ser finamente regulados para ser activados o inactivados durante el ciclo celular.

10. Las células iPS humanas mostraron una actividad alta de telomerasa.

Las células pluripotentes que se mantienen indiferenciadas tienen una alta actividad de telomerasa. El envejecimiento celular está asociada con la degradación de los telómeros, los cuales son las partes terminales de los cromosomas. La función de las secuencias repetitivas de los telómeros es dar estabilidad estructural a los cromosomas y protegerlos a lo largo de

las divisiones celulares. El que haya una alta actividad telomerasa demuestra que las células tienen un carácter pluripotente y sin diferenciación.

11. Para determinar la habilidad de diferenciación en las células iPS humanas, se utilizaron cultivos flotantes de cuerpos embrioides. Las células unidas mostraron diferentes tipos de morfologías. Esto demuestra que las células iPS se pueden diferenciar en las tres capas germinales *in vitro*.

Siguiendo el orden metodológico del trabajo anterior, los investigadores se preguntaron si sería posible generar células diferenciadas a partir de sus células inducidas. La diferenciación *in vitro* dio como resultado células de las tres capas germinales, con características morfológicas propias para cada tipo celular.

12. Con la examinación de la diferenciación podía ser inducida por métodos reporteros, las células se dispersaron drásticamente, y algunas estructuras neuronales fueron observadas. El análisis por PCR demostró la expresión de marcadores de neuronas dopaminérgicas. La expresión de GFAP no fue inducido con este sistema. Por otro lado, la expresión de *OCT3/4*, y *NANOG* disminuyó considerablemente. Estos datos demostraron que las células iPS se pueden diferenciar en células neuronales, incluyendo en dopaminérgicas, por el cocultivo con las células PA6.

Para demostrar que la diferenciación neuronal se había logrado, los investigadores buscaron marcadores específicos de las neuronas. Además de esto, se buscaron indicios de que la célula se había diferenciado y esto se encontró con la disminución de dos genes específicos de células madre embrionarias.

13. Doce días después de la diferenciación directa cardíaca de células iPS humanas, empezaron a latir. El análisis de expresión por medio de RT-PCR mostró que estas células expresaron marcadores de cardiomiocito. La expresión de *OCT3/4*, *SOX2* y *NANOG* disminuyó. Estos datos mostraron que las células iPS humanas pueden diferenciarse en miocitos cardíacos *in vitro*.

Lo mismo que con las células neuronales, se buscó demostrar que las células diferenciadas en cardíacas tenían el mismo fenotipo que las reales. Se buscaron marcadores de cardiomiocitos en las inducidas, así como la disminución de marcadores propios de células indiferenciadas. Ambas cosas fueron encontradas, lo que demostró la diferenciación de éstas en células cardíacas.

14. Se observó la formación de un tumor para probar la pluripotencia *in vivo*. La examinación histológica mostró que el tumor contenía diferentes tejidos, como músculo estriado (mesodermo), cartílago (mesodermo), tejido neuronal (ectodermo), entre otros.

Ya comprobada la diferenciación celular en cultivos, los investigadores buscaron generar diferenciación en tumores de ratón, es decir, en cultivo *in vitro*. A lo largo de varios días, se encontró la diferenciación de células en tres capas germinales. Este resultado concuerda con el trabajo anterior.

15. La PCR del DNA de células humanas iPS, mostró que todos los clones tienen integración de los cuatro retrovirus. El análisis de southern blot con cDNA de *c-Myc* reveló que cada clon tiene un patrón único de sitios de integración retroviral. Los clones de iPS derivaron de HDF y no fueron resultado de una contaminación cruzada.

Finalmente, y siguiendo con el orden metodológico de la inducción de células de ratón, en este trabajo se buscó demostrar que la generación de células indiferenciadas no se había hecho a través de contaminación de otras células madre embrionarias humanas. Por medio de PCR y de southern blot se demostró que no sólo se tiene la presencia de los mismos genes sino también las cantidades.

16. Se generaron células iPS a partir de otras células somáticas humanas.

Los resultados obtenidos por ambas investigaciones respondieron a las preguntas generales y particulares, en tanto que fue posible inducir pluripotencia en ambas líneas celulares. A pesar de que en los dos trabajos se habla de las implicaciones médicas, no se hace referencia sobre la importancia evolutiva de estos trabajos, ni siquiera como la causalidad de que algunos eventos no resultaran como lo esperado, por ejemplo, con el caso de Nanog.

3.3 Trabajos posteriores a Yamanaka y colegas

En su trabajo de 2012, además de presentar los antecedentes que formaron el argumento para su investigación, Yamanaka menciona publicaciones posteriores trascendentes realizados desde el 2006, año de su publicación con células de ratón, y hasta 2012, fecha del artículo.

- R. Jaenisch, K. Hochedlinger, S. Yamanaka. Germiline trasmission (2007)

- R. Jaenisch. Mouse iPSC therapy (2007)
- D. Melton. In vivo direct reprogramming (2008)
- G. Daley. Patient iPSc (2009)
- M. Wernig. In vitro direct reprogramming (20¹⁰)
- Masumi Abe. Transplante sin rechazo (2013) (este fue introducido por mi)
- Yang Xu. Immunogenicity of iPSc (2011)

En 2007, Yamanaka y colegas publican la inducción de células pluripotentes humanas. Ese mismo año, el autor menciona diferentes trabajos realizados por múltiples científicos bajo tres líneas de investigación: iPSc humanas (la suya), transmisión de líneas germinales y terapia en ratones con células iPS.

En uno de los trabajos de Rudolf Jaenisch y Konrad Hochedlinger (Maherali, N. 2007) lograron generar células iPS a partir de fibroblasto para caracterizar su estado epigenético. Como parte de los resultados obtenidos, encontraron la reactivación del cromosoma X en células femeninas, mismo que se inactivó de manera aleatoria en la diferenciación posterior. Demostraron que la reprogramación del factor de transcripción inducido dio como resultado la reversión global del epigenoma somático hasta ser similar al de las células madre embrionarias. Además, la caracterización dio como resultado un estado similar de las iPS con las células madre embrionarias. Debido a este último resultado, los investigadores concluyeron que la reprogramación anormal epigenética no debe comprometer la utilidad terapéutica de las células reprogramadas. Este estudio, como mencionan ellos, es un paradigma de estudio para abordar las modificaciones epigenéticas relacionadas con la reprogramación nuclear.

El mismo año, Jaenisch y Hochedlinger (Wernig, M. 2007) demostraron en otro trabajo que la metilación del DNA, la expresión genética y el estado de la cromatina de las células inducidas es similar al de las células madre embrionarias. A partir de células derivadas de fibroblastos de ratón lograron formar quimeras viables y contribuir con esto a la línea germinal; generaron embriones cuando fueron inyectados a blastocistos tetraploides. Sus resultados establecieron que las células somáticas pueden ser reprogramadas a un estado pluripotente similar, pero no idéntico, al de las células madre embrionarias; demostraron que la potencia biológica y el estado epigenético de las células iPS es indistinguible de las células madre embrionarias.

Otro ejemplo es Jaenisch (Hanna, J. 2007) donde menciona que el potencial terapéutico de las células iPS estaba sin definir hasta entonces. Con este trabajo, mostró que los ratones pueden ser curados de anemia después de haber recibido un trasplante de células hematopoiéticas derivadas de iPS. Esto demuestra que a partir de reprogramación inducida y terapia genética y celular, es posible tratar la enfermedad en los ratones. Sin embargo, plantea algunas cuestiones no resueltas: los problemas asociados con el uso de retrovirus y oncogenes para reprogramación necesita ser resuelto antes de que éste grupo de células sean consideradas para la terapia humana. El debate ético que surgiría de la clonación terapéutica y la dificultad técnica junto con la dificultad de llevar a cabo el proceso.

En 2008, Douglas Melton planteó el problema sobre la nula existencia de un entendimiento general sobre cómo convertir un tipo celular a otro en una manera controlada. Por tanto, en uno de sus trabajos (Zhou, Q., 2008) planteó una estrategia donde, la reexpresión *in vivo* de reguladores clave para el desarrollo identificó una combinación específica de tres factores transcripcionales (*Ngn3*, *Pdx1* y *Mafa*) que reprograman células pancreáticas diferenciadas de ratones adultos a ejemplares que se asemejan a las células beta. Este estudio, como mencionan los investigadores, es un ejemplo del uso de factores definidos en un órgano adulto, lo que sugiere un paradigma general para dirigir la reprogramación celular sin necesidad de la reversión a un estado pluripotente.

Debido a que hasta ese mismo año se había reportado que diferentes líneas celulares expresaban marcadores similares en estado indiferenciado pero la expresión se volvía variable después de que las células comenzaban a diferenciarse, el autor publicó la comparación del potencial de diferenciación de 17 líneas celulares madre embrionarias humanas. Con este trabajo, el autor demostró que las variantes en el potencial de desarrollo de estas líneas celulares deben ser monitoreadas en tanto avanza el proceso de diferenciación.

En 2009, George Daley (Loh, Y. 2009) menciona que anteriormente, se había podido reprogramar células a partir de queratinocitos humanos. Sin embargo, esto no era una garantía de que dichas células fueran una fuente confiable para la reprogramación debido a diferentes factores. Además, está el antecedente de que los fibroblastos obtenidos de biopsia de piel pueden ser reprogramados directamente por la expresión ectópica de factores de transcripción definidos. En su trabajo, describe la formación de células iPS a

partir de células de sangre periférica humana, utilizando transducción retroviral de los factores *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *Myc*. Como conclusión, aseguran que la reprogramación de células sanguíneas permitirá la generación específica para cada paciente de células madre embrionarias, para tratamiento de enfermedades.

Ante la pregunta de que si los factores de transcripción pueden inducir directamente otros destinos celulares y no sólo estados indiferenciados, Marius Wernig (Vierbuchen, T. 2010) y colegas, hipotetizaron que la expresión combinada de factores de transcripción específicos para linajes neuronales pudieran convertir directamente fibroblastos a neuronas. De 19 genes candidatos, encontraron que sólo tres factores son necesarios para realizar esta tarea *in vitro*. A estas las llamaron células neurales inducidas (iN). Concluyeron que esta generación puede tener implicaciones importantes para estudios del desarrollo neuronal, para la modelación de enfermedades neurológicas y para la medicina regenerativa.

Yamanaka esquematiza dos posibles líneas de investigación que podrían surgir de los trabajos ya mencionados: la terapia de células iPS humanas y la generación de medicamentos relacionadas con esta línea celular. Poco tiempo ha pasado desde la publicación del trabajo de 2012 de Yamanaka, donde hace esta recopilación, por lo que no es posible hablar de por lo menos dos trabajos que estén respondiendo estas dos líneas de investigación. Sin embargo, recientemente han surgido mucho trabajos enfocados en inmunidad y la aceptación de células inducidas por parte de ratones (Zhao, T. *et al.* 2011; Araki, R. *et al.* 2013)

Cabe destacar que hasta ahora se han podido generar iPS a partir de múltiples tipos celulares: queratinocitos, células mesenquimáticas, mucosa oral, células de la pulpa dental, sangre periférica¹⁴, sangre del cordón umbilical y fibroblastos de piel. Incluso se ha podido generar células madre embrionarias a partir de la inducción de proteínas –las células reciben el nombre de piPSCs (*protein-induced pluripotent stem cells*). Esto es una alternativa para no introducir modificaciones genéticas exógenas, así que se introducen las proteínas reprogramadas directamente a las células. Además, muchas otras transformaciones se han hecho, como la líneas celulares derivadas de epiblasto, llamadas

¹⁴ La sangre periférica es la principal fuente de células para trasplante hematopoiético, inmunoterapia y terapia génica. Este trabajo es la primera prueba de que las células de sangre humana son maleables para la reprogramación. Con esto no se necesitarán biopsias de piel además de que requieren menos mantenimiento en cultivo antes de ser reprogramadas. Esto significa un paso importante hacia el desarrollo de caminos eficientes hacia la generación de células iPS (Loh, Y. 2009).

células EpiSC (*post-implantation epiblast-derived stem cells*), las cuales presentan factores de transcripción que regulan la pluripotencia, mantienen su integridad genómica y se diferencian en tipos celulares somáticas (Tesar, P. *et al.* 2007).

De la misma manera, se han podido diferenciar células a partir de iPS, por ejemplo, en endodermo hepático (Sullivan, G. *et al.* 2010).

En el siguiente capítulo se hablará sobre las implicaciones evolutivas de ambos trabajos, así como los alcances en el futuro de esta tecnología.

3.4 Análisis de resultados

Con su trabajo, Yamanaka y colaboradores revolucionaron el campo de la reprogramación en células [que como vimos, ya se hacía desde la década de los 60's con la transferencia nuclear (Gurdon, J. 1962) y que dio como resultado, entre muchas cosas, a la oveja Dolly (Wilmut, I. *et al.* 1997)] cuando utilizaron la transfección viral de cuatro genes a una célula adulta de fibroblasto de ratón. Después de la selección de la expresión de los cuatro factores, las células madre resultantes formaron todos los linajes cuando fueron trasplantadas a embriones inmunotolerantes.

En otros estudios se ha visto que las iPS de células somáticas requieren del mismo grupo de factores utilizados en ratones o la combinación de *Oct4*, *Sox3*, *Nanog* y *lin28* (Gurdon, J. y Melton, D. 2008). Por investigaciones así, es evidente que son varias las cuestiones que no se resuelven en el trabajo de Yamanaka y colaboradores (Wernig, M. *et al.* 2007):

- Las iPS y las células madre embrionarias, a pesar de que ambas son pluripotentes, no son idénticas entre sí¹⁵.
- El perfil de expresión genético reveló grandes diferencias entre las células iPS y las células madre embrionarias.
- No está claro porqué las células podían ser inducidas para diferenciarse y si la expresión continua del vector era necesaria para el mantenimiento del estado pluripotente, esto debido a que los cuatro vectores fueron transducidos por vectores retrovirales.

¹⁵ Es posible que hayan otros factores necesarios para inducir una reprogramación completa. Uno de sus candidatos es el ECAT1.

- El estado epigenético de los genes endógenos *Oct3/4* y *Nanog* tuvo una reprogramación incompleta, lo que hace dudar sobre la estabilidad del estado pluripotente [El patrón epigenético fue intermedio entre los fibroblastos y las células madre embrionarias (Maherali, N. *et al.* 2007)].
- El uso de integraciones retrovirales acarrea problemas en el sentido de que se ha visto que aumentan el riesgo de generación de tumores.
- Las células iPS *Fbx15* contribuye a diversos tejidos en la gestación media de los embriones. Sin embargo, estos embriones sucumben indicando un potencial de desarrollo restringido de las iPS comparado con las células madre embrionarias (Maherali, N. *et al.* 2007).

Las observaciones generaron tres preguntas fundamentales acerca de la naturaleza molecular y funcional de células reprogramadas (Maherali, N. *et al.* 2007):

- ¿Puede la selección de un gen, que es esencial para el estado de las células madre embrionarias, generar células pluripotentes que son más similares a las células madre embrionarias que las que fueron descritas previamente (*Fbx15*)?
- ¿El estado pluripotente de las iPS depende de la expresión continua de factores exógenos?
- ¿Los factores de transcripción inducen la reprogramación de el paisaje epigenético del genoma del fibroblasto a uno de una célula pluripotente?

Los trabajos de Yamaka y colegas han atraído la atención por el potencial de esta tecnología, por ejemplo, en terapias médicas. Sin embargo, ésta acarrea problemas éticos y técnicos, como la baja eficiencia.

3.4.1 Descripción de *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*

Son cuatro los factores que Yamanaka y su equipo emplearon para desdiferenciar células diferenciadas. A continuación una descripción de cada uno de ellos, así como de *Nanog*, factor que el investigador japonés encontró dispensable pero que otros trabajos lo califican como central.

El gen *POU5F1* codifica para un factor de transcripción, de un homeodominio POU, de clase 5 con homeobox (factor de transcripción) 1 (de ahí el nombre), el cual tiene un papel importante en el desarrollo embrionario y es necesario para la pluripotencia de las

células madre embrionarias. Es de resaltar que los factores de transcripción que codifican para un homeodominio están evolutivamente conservadas y juegan papeles clave en la especificación del destino celular en muchos organismos (Boyer, L. *et al.* 2005).

El splicing alternativo y codones de iniciación con traducción alternativa da como resultado múltiples isoformas. En el humano, la localización de este gen es en el cromosoma 6 en el brazo p y, además, se han identificado pseudogenes relacionados en los cromosomas 1, 3, 8, 10 y 12. En *Mus musculus* se encuentra en el cromosoma 17 (Fig. 16) (NCBI, 2013).

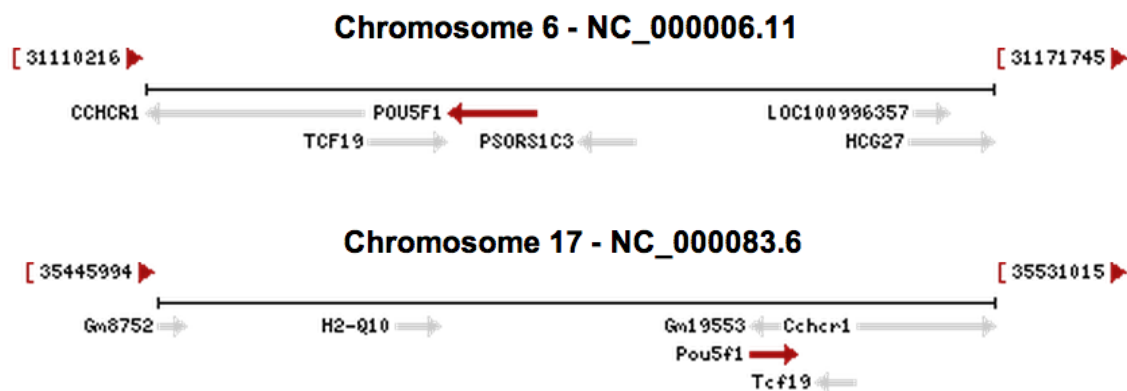


Figura 16. Genes POU5F1. El gen contenido en el cromosoma 6 corresponde al humano mientras que el del cromosoma 17 es de *M. musculus*. Los genes cercanos son diferentes en ambas especies, excepto por *CCHCR1*. El marco de lectura también es diferente. (Fuente: NCBI)

*Oct3/4*¹⁶ es la proteína derivada del gen que funciona como factor de transcripción y está asociada con el automantenimiento y la indiferenciación de las células madre embrionarias y con la ICM (Grskovic, M. y Rmalho-Santos, M. 2008). Por tal motivo, es un marcador de células toti y/o pluripotentes indiferenciadas y de tumores. La expresión de *Oct4* es única para células germinales, embriones preimplantados y el epiblasto de embriones postimplantados (Tada, M. *et al.* 2001). La razón por la que está asociada con la formación de tumores, en el caso de humanos, es debido a la translocación de este gen con el gen de sarcoma de Ewing. El splicing alternativo, así como el uso de codones de

¹⁶ En la literatura se puede llegar a encontrar para humanos como Oct4, Oct3, OTF3, OTF4, OTF-3, Oct-3 y Oct-4. En *M. musculus*, además de las anteriores, se pueden encontrar otras como NF-A3, entre otras. Estos términos son sinónimos.

iniciación alternativas, resulta en múltiples isoformas. A pesar de que se ha estudiado en ratones, ratas, humanos y peces cebra, la localización de este gen no se encuentra en el mismo cromosoma. Se sabe que *Oct4* interactúa con otros factores de transcripción para activar y reprimir la expresión genética en las células madre embrionarias de ratón (Boyer, L., *et al.* 2005). *Oct4* está presente en células madre en la vida adulta, como en médula ósea, además de que juega un papel importante en el mantenimiento de la pluripotencia de estas células. Además, su estado metilado está relacionado con la estructura de la cromatina de este gen. Este mecanismo epigenético juega un papel esencial en la etapa de desarrollo y en la expresión específica para cada tipo celular (Pain, D. *et al.* 2005).

El gen *Sox2*¹⁷ toma su nombre de SRY (*sex determining region Y*)-box 2 para humanos y *Mus musculus*. Es un gen sin intrones que codifica para un miembro de la familia SRY HMG-box de factores transcripcionales relacionados con la regulación del desarrollo embrionario y la determinación del destino celular, ya que el factor de transcripción se expresa en las células madre de la masa interna de los blastocistos. El producto de este gen es necesario para el mantenimiento de las células madre en el sistema nervioso central, además de que regula la expresión genética en el estómago. El factor de transcripción forma un complejo con *Oct4* en el DNA y controla la expresión de muchos genes relacionados con el desarrollo embrionario como *YES1*, *FGF4*, *UTF1* y *ZFP206*. Funciona como switch para el desarrollo neuronal y mantiene a las células nerviosas indiferenciadas. Tanto en *M. musculus* como en humano, el gen se localiza en el cromosoma 3. Debido a su papel esencial en la embriogénesis temprana, el promotor y la proteína están bien conservados en la evolución de los vertebrados; la expresión de *Sox2* en estos animales es regulada por la acción combinada de muchos enhancers, conservados en un gran rango de especies, que están acomodados en una región genómica alrededor del gen, con distintas especificidades espacio-temporales (Kamachi, Y. *et al.* 2009).

El gen *Myc*¹⁸ toma su nombre de *myelocytomatosis oncogene*, el cual codifica para una fosfoproteína multifuncional que tiene el papel celular de la progresión del ciclo, transformación y apoptosis. Sobre todo, funciona como un factor de transcripción que regula este fenómeno en genes blanco específicos. Se ha visto que la existencia de puntos

¹⁷ También conocido como ANOP3 y MCOPS3 para humanos y como Icc, ysb en ratones.

¹⁸ También conocida como mMyc, c-Myc y RNCMYC para *Rattus norvegicus*. Para *M. musculus* están Myc2, Nird, Niard, bHLHe39 y AU016757.

alternativos de iniciación de la traducción genera dos isoformas con distintos N-terminales en ratones y humanos; los mRNA's de ratas tienen una secuencia similar al de *M. musculus* y humanos, lo que sugiere que también produce dos proteínas. La mutación, sobre-expresión, traslocación y rearrreglo de este gen ha sido asociado con una variedad de tumores hamotopoyéticos, leucemias y linfomas. En *Rattus norvegicus* se localiza en el cromosoma 7 en el brazo q mientras que para *M. musculus* se localiza en el cromosoma 15. Un dato interesante es que este factor está altamente expresado en embriones en desarrollo, en donde regula el tamaño corporal por el control de la proliferación celular pero no del tamaño de cada célula (Zhong, W. *et al.* 2006). Está asociado con el mantenimiento de la cromatina activa (Grskovic, M. y Rmalho-Santos, M. 2008).

El gen *Klf4*¹⁹ (Kruppel-like factor 4) es un factor de transcripción que puede actuar como represor o activador. Se une a las regiones que presentan una secuencia 5'-CACCC-3' de su propio promotor y activa su propia transcripción. Además de eso, regula la expresión de factores de transcripción clave durante el desarrollo embrionario. Está relacionado con la diferenciación de las células epiteliales y es necesario para establecer la función de barrera de la piel. Contribuye con la regulación de la transcripción de p53. En humanos se localiza en el cromosoma 9 del brazo q mientras que en *M. musculus* en el cromosoma 4.

El gen *Nanog* es el regulador maestro de la autorenovación (Navarro, P. *et al.* 2012). Es un factor de pluripotencia que se expresa en las células madre embrionarias y en las células germinales primordiales del embrión de ratón (Grskovic, M. y Rmalho-Santos, M. 2008). Además, es un gen específico de amniotas y está ausente en anamniotas y vertebrados (Cañón, S. *et al.* 2006). Este factor que codifica para un homeodominio fue originalmente identificado por su papel en el mantenimiento de la pluripotencia de las células madre embrionarias de ratón. La pérdida de la función de *Nanog* lleva al embrión de ratón formar linajes extraembriónicos. Homólogos de este factor han sido identificados en ratas, primates y vacas y tienen el mismo papel en la pluripotencia de células madre embrionarias humanas. El gen, en humanos, está ubicado en el cromosoma 12 del brazo p, una región comúnmente duplicada en las células germinales tumorales. Por tanto, *Nanog*

¹⁹ En *M. musculus* y en humanos se le conoce como EZF Gklf; en la primera especie también se le conoce como Zie.

tiene un papel esencial como un factor de pluripotencia en mamíferos y su mala regulación puede llevar al crecimiento celular descontrolado y a la formación de cáncer. La expresión heterogénea permite decisiones importantes en su destino y la eliminación de esto está asociada con el fallo de la embriogénesis y con la resistencia de las células ES para diferenciarse (Navarro, P. *et al.* 2012). De hecho, mientras que la expresión de *Oct4* y *Sox2* es relativamente uniforme en las células madre embrionarias, éstas fluctúan entre estados de expresión alta de *Nanog*, presentando alta eficiencia de autorenovación, y bajos niveles de expresión, presentando una disminución en la diferenciación.

Sin embargo, se sabe poco acerca de la conservación evolutiva entre los mamíferos y otros vertebrados. Por ejemplo, muchos pseudogenes se han identificado en primates y roedores pero la mayoría corresponden a pseudogenes procesados que son el resultado de transcripción y retrotransposición de este locus en el epiblasto pluripotente (Cañón S. *et al.* 2006).

Una vez mencionadas las características de estos genes, es de resaltar algunas de las funciones que se han encontrado cuando operan juntos.

Un resultado importante de los estudios de Yamanaka fue que *Nanog* es indispensable. Esto salta a la vista debido a que *Nanog*, *Oct3/4* y *Sox2* forman una red núcleo de factores de transcripción que dan soporte a la autorenovación de las células madre embrionarias (Navarro, P. 2012), tienen un papel en el desarrollo temprano y son necesarios para la propagación y indiferenciación de éstas (Boyer, L. *et al.* 2005). De hecho, *Nanog* funciona coordinadamente con estos dos factores para establecer la identidad celular en las células madre embrionarias (Wang, J. *et al.* 2006).

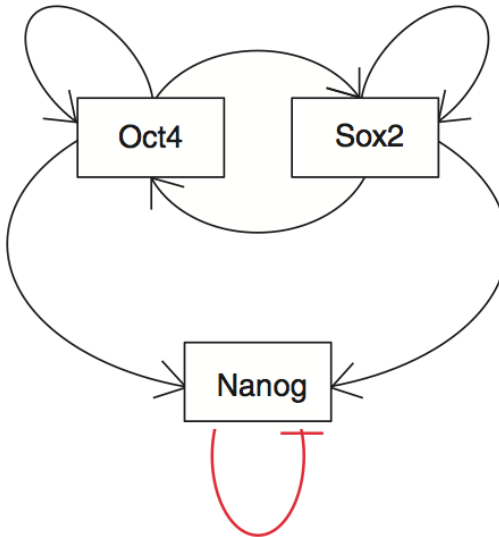


Figura 17. Red núcleo El esquema muestra la arquitectura del núcleo de la red de pluripotencia inferida a partir de análisis genómicos. *Nanog* activa la transcripción de *Oct3/4* y de *Sox2*, dos factores de pluripotencia adicionales, lo cual permite que se auto-activen, que se activen entre ellos y a *Nanog*. Se sabe que la actividad de *Nanog* es autorepresiva, es decir que el control de la transcripción de este modula su expresión genética heterogénea (Navarro, P. 2012). *Oct4*, *Sox2* y *Nanog* promueven la pluripotencia y la autorenovación a través de regulación positiva de sus propios genes y de los genes que codifican componentes de las redes de señalización de estos fenómenos (Boyer, L. *et al.* 2005). (Fuente: Navarro, P. 2012)

Estos factores de transcripción tienen papeles esenciales en el desarrollo temprano y son necesarios para la propagación de células madre embrionarias en cultivo. Incluso, Laurie Boyer y colegas (2005) mencionan que, después de identificar los genes blanco de estos factores, se ha encontrado que éstos co-ocupan una porción substancial de genes blanco en humanos (al menos 353 genes), muchos de los cuales codifican para factores de transcripción de homeodominio importantes para el desarrollo, además de que contribuyen para circuitos regulatorios especializados in las células madre embrionarias (Fig. 18) (Boyer, L. *et al.*, 2005).

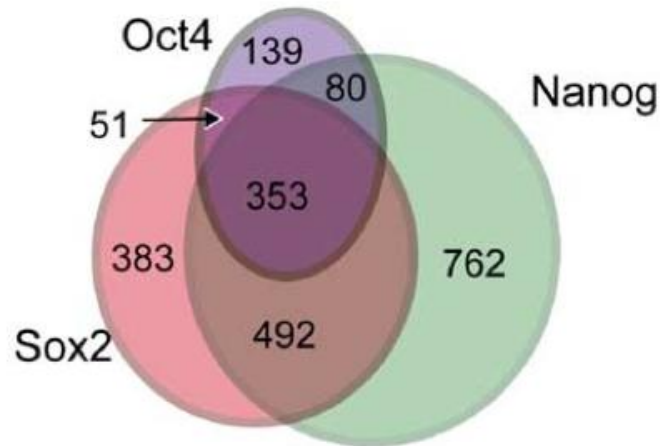


Imagen 18. Número de genes blanco en células madre embrionarias humanas para *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* Este diagrama de Venn representa el sobrelape de las regiones promotoras. Boyer y colegas demostraron que estos tres factores de transcripción regulan funcionalmente a los genes que co-ocupan y la pérdida de los reguladores de la diferenciación, resulta en el aumento de la expresión de genes necesarios para el desarrollo y reduce la expresión de un grupo de genes necesarios para el mantenimiento de la identidad de células madre (Fuente: Boyer, L., *et al.* 2005).

Se cree que estos tres factores son centrales para la jerarquía regulatoria transcripcional que especifica la identidad de las células madre embrionarias debido a su patrón único de expresión y sus papeles esenciales durante el desarrollo temprano (Boyer, L., *et al.* 2005). De hecho, se ha estudiado el perfil de expresión genética de células madre embrionarias y se ha visto que los genes que se ven afectados por la regulación de Oct4 son igualmente afectados por la regulación de *Nanog* o *Sox2*, lo que indica que estos tres factores cooperan para controlar genes blancos de la transcripción (Fig. 19) (Grskovic, M. y Ramalho-Santos, M. 2008).

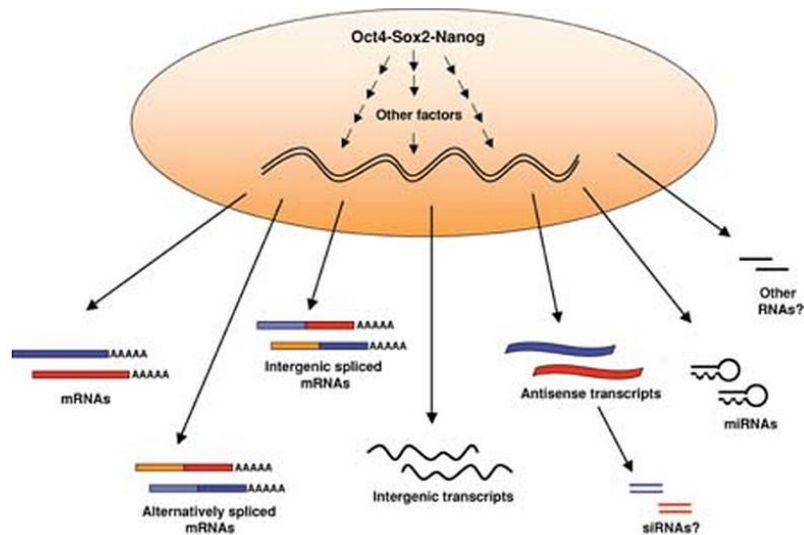


Figura 19. El transcriptoma de las células madre embrionarias. Los reguladores centrales de la pluripotencia, *Oct3/4*, *Sox2* y *Nanog*, actúan junto con otros factores de transcripción y modificadores de la cromatina para establecer y mantener el programa transcripcional de la pluripotencia (Grskovic, M. y Rmalho-Santos, M. 2008).

Las proteínas de *Nanog* funcionan con proteínas asociadas, como las de *Oct3/4*, en una red altamente enriquecida de factores nucleares que son críticos para el mantenimiento del estado de pluripotente de las células madre embrionarias y correguladas en la diferenciación (Wang, J. *et al.* 2006). Sumado a esto, Keita Kinoshita y colegas mencionan que *Oct3/4*, *Nanog*, *Sox2* y *STAT3*, un transductor de señal y activador de la transcripción, son esenciales para la autorenovación de las células madre embrionarias (Kinoshita, K. *et al.* 2007).

Además, *Oct3/4* y *Nanog* son reguladores esenciales en el desarrollo embrionario temprano y en la identidad de las células madre embrionarias en tanto que son factores de transcripción con homeodominios conservados a lo largo de la evolución, y que juegan papeles esenciales en la especificación del destino celular de muchos organismos (Boyer, L., *et al.* 2005). Chih-Chien Tsai y colegas mencionan que los papeles de estos dos en el mantenimiento de la autorenovación y de la indiferenciación de las células madre adultas no está claro, sin embargo, demostraron que ambos regulan a *Dnmt1*, enzima relacionada con patrones de metilación, para mantener estos dos estados (Tsai, C. *et al.* 2012); anterior a los estudios de Yamanaka y colegas, ya se sabía de estos dos factores, además de otros

más como son Stela y GDF3 son esenciales para el mantenimiento del estado pluripotente (Pain, D. *et al.* 2005).

Esto es comprensible si se entiende que *Nanog*, en su amplio patrón de funcionalidad, es un componente de complejos proteínicos múltiples (Fig. 20) (Wang, J. *et al.* 2006).

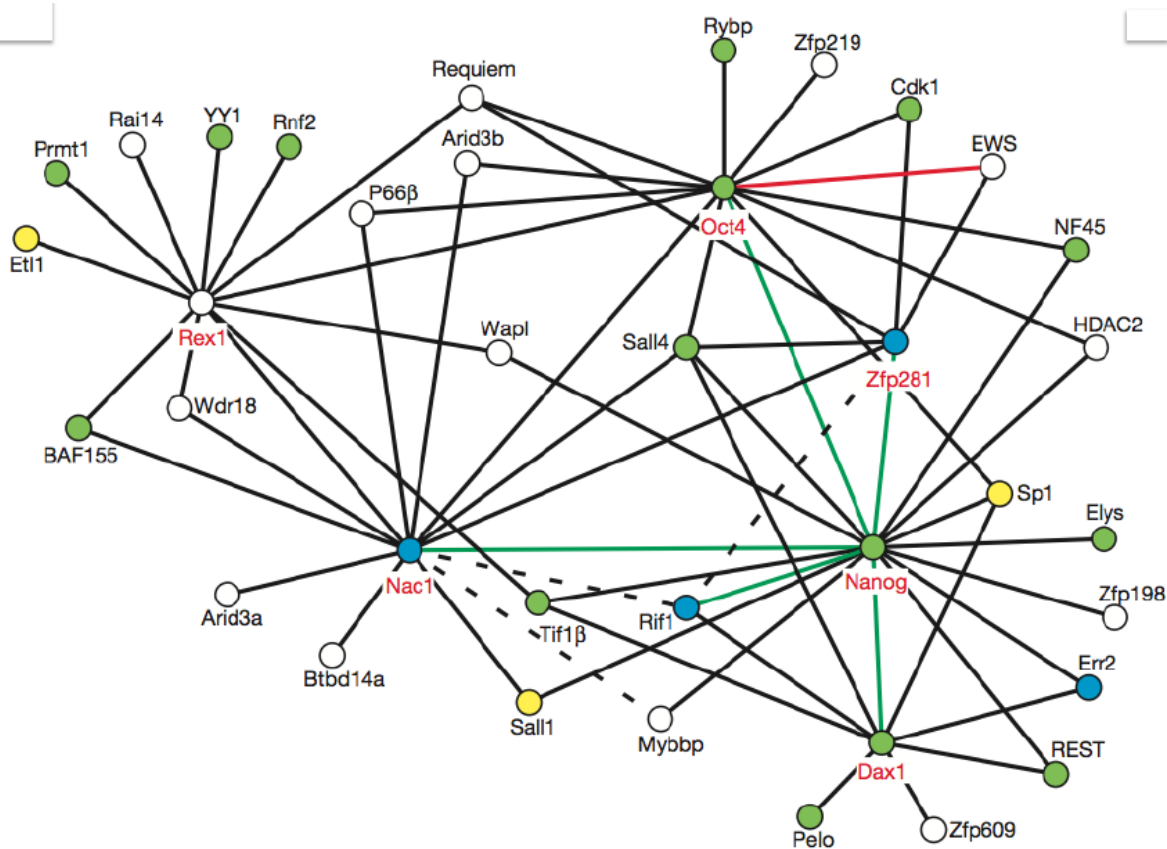


Figura 19. Representación de las características de las interacciones de *Nanog* con otros factores. Algunas características sugieren que la red está especializada para establecer y/o mantener la pluripotencia de las células madre embrionarias. De hecho, la red está enriquecida de proteínas necesarias para controlar la supervivencia o la diferenciación de la masa interna de las células, o aspectos del desarrollo temprano. Muchos de los genes que codifican para estas proteínas están regulados en la diferenciación de las células madre embrionarias. Las múltiples interacciones entre los factores críticos predice que las proteínas de la red influyen positiva o negativamente la función de otros miembros; su función de factores blanco y de efectores indica que este “interactoma” sirve como un módulo funcional para mantener la pluripotencia (Fuente: Wang, J. 2006).

Un dato encontrado por Huabing Yuan (1995) fue que *Sox2* y *Oct3/4* requieren de una actividad sinérgica para promover la actividad transcripcional del promotor de FGF-4, el factor de crecimiento de fibroblastos, una molécula señal cuya expresión es esencial para la postimplantación del ratón. Este factor de crecimiento fue el primer gen blanco identificado sobre el que actúa *Oct3/4* y para cualquiera de los factores *Sox* (Yuan, H., *et al.*, 1995). Esta relación es clara si se toma en cuenta que los sitios de unión conservados de POU en el enhancer de *Sox2* regulan la expresión genética en células madre neuronales y embrionarias.

Otra pareja que tiene un papel importante es la de *c-Myc* con *Ras*, proteína que regula una gran variedad de rutas de transmisión de señales celulares, como diferenciación, pues ambas permiten la progresión del ciclo celular (Leone, G. *et al.* 1997).

A pesar de que Yamanaka y colegas encontraron que *Nanog* es dispensable, Yui-Han Loh y colegas (2009) demostraron que para inducir a las células somáticas de ratón y humano, se necesita la expresión forzosa de *Oct3/4* y *Sox2* con la combinación de *Klf4* y *Myc* o *Nanog* y *Lin28*. De la misma manera, Marius Wernig y colegas (2007), utilizaron la activación endógena de los genes *Oct3/4* y *Nanog* como una estrategia para reprogramar células. Ellos infectaron a los fibroblastos con vectores retrovirales que incluían a los cuatro factores de Yamanaka y seleccionaron una activación endógena de los genes *Oct3/4* o *Nanog*. Con esto, los autores pudieron concluir que el estado pluripotente de las células de ambos genes es inducido por la transducción viral de los cuatro factores pero es mantenida por la actividad de factores de pluripotencia como son *Oct3/4*, *Nanog* y *Sox2*. Encontraron, además, que los niveles de estos tres factores son iguales en células iPS y en células madre embrionarias; los genes *Oct3/4* y *Nanog* se hipometilan en ambas células, y las modificaciones de las marcas bivalentes de histonas se reestablecen. Como mencionan los autores, el uso de retrovirus es una gran barrera para el uso de las células reprogramadas en aplicaciones terapéuticas (Wernig, M. *et al.* 2007).

A pesar de todo lo mencionado, según mencionan M. Grskovic, M. y M. Rmalho-Santos (2008), Chambers mostró que es posible derivar células madre embrionarias que no tenían *Nanog* pero que sí tenían los marcadores de pluripotencia, incluyendo a *Sox2* y a *Oct3/4*. Parece ser que más que ser esencial para establecer la pluripotencia, *Nanog*

funciona para reforzar la estabilidad del estado pluripotente (Grskovic, M. y Rmalho-Santos, M. 2008).

En este capítulo se revisaron los resultados de ambos trabajos realizados por Yamanaka y colegas, y se complementaron con una descripción de los cuatro factores, que incluye la relación de todos en la red genética regulatoria durante el desarrollo. En el siguiente capítulo se discutirán las implicaciones evolutivas de los cuatro factores.

Capítulo 4. Significado evolutivo de los genes

En capítulos anteriores se describió el trabajo realizado por el equipo de Yamanaka sobre los genes regulatorios (*Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Nanog*); también se señaló la importancia que dicho trabajo tiene en el terreno de las investigaciones biomédicas. A continuación abordaré el asunto sobre cuál es la importancia de estos cuatro factores en el campo de las discusiones evolutivas, profundizado en seis puntos particulares: la pluripotencia, la respuesta inmune, cuestiones sobre la evolución y el determinismo genético, la regulación epigenética, los factores de transcripción y las redes regulatorias.

En este capítulo se trabajará el significado evolutivo de los cuatro genes regulatorios de Yamanaka y colaboradores. El objetivo es discutir las implicaciones evolutivas de éstos, con los que lograron desdiferenciar células epiteliales. En este cuarto capítulo se entenderá la relación que existe entre lo mencionado sobre los cuatro factores de transcripción y la teoría evolutiva del desarrollo, es decir, concebir a estos genes del desarrollo como un modelo evolutivo.

4.1 Implicaciones evolutivas de los resultados

4.1.1 Pluripotencia, células ES e iPS

El desarrollo mamífero necesita de la especificación de 200 tipos celulares a partir de una sola célula totipotente (Boyer, L. *et al.* 2005). Las células totipotenciales son células que se pueden diferenciar en células embrionarias o extraembrionarias, por lo que pueden construir un organismo completo. Existen otras clasificaciones para células con potencialidades diferentes. Las células multipotenciales son aquellas que se pueden diferenciar en muchos tipos celulares pero sólo aquellos de familias cercanas. Las células oligopotenciales son aquellas que se pueden diferenciar en algunas como linfoides o mieloide. Las células unipotentes son aquellas que generan sólo un tipo celular con la posibilidad de auto-renovarse. Finalmente, están las células pluripotenciales, las cuales contienen a las células madre (Fig. 21).

Las células madre (stem cells), son aquellas que tienen el potencial de desarrollarse en cualquier tipo celular durante el desarrollo o el crecimiento. Estas células tienen dos características que las hacen únicas del resto: 1) son células no especializadas capaces de

regenerarse a sí mismas por división celular y 2) pueden ser inducidas para convertirse (diferenciarse) en cualquier célula especializada de las tres capas germinales (Navarro, P. *et al.* 2012), es decir, son pluripotentes. Las células iPS del trabajo de Yamanaka, también son pluripotentes.

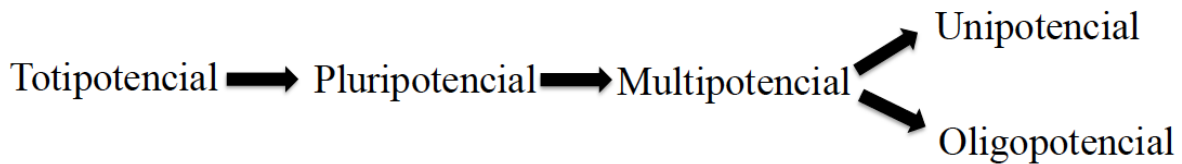


Figura 21. Representación de la jerarquización y relación descendiente de la potencia de las células. Las células totipotentes son producidas por la fusión de un oocito con esperma; las células que conforman la mórula son totipotentes. Las pluripotentes se pueden encontrar en las células madre embrionarias, las cuales forman la masa celular interna (ICM, por Inner Cell Mass) en el blastocisto; pueden dar lugar a cualquier tejido del cuerpo.

Las células madre embrionarias o *Stem Cells* (ES cells) son derivadas de las células totipotenciales de embriones de mamíferos capaces de proliferación ilimitada *in vitro*, sin perder la capacidad de generar cualquier tipo celular (Boyer, L. *et al.* 2005) y con el gran potencial de la medicina regenerativa (Grskovic, M. y Ramalho-Santos, M. 2008). El término para nombrar a estas células fue introducido para distinguir estas células derivadas de embriones de las células derivadas de teratocarcinomas debido que morfológica, bioquímica e inmunológicamente presentan propiedades en común, funcionando así como un modelo para el estudio del desarrollo embrionario (Martin, G. 1981). Por su proveniencia, éstas células madre embrionarias dan pistas sobre los eventos del desarrollo que no pueden ser estudiados directamente en embriones humanos por cuestiones éticas. Estas células presentan alta actividad de telomerasa, característica que les confiere un tiempo de vida más largo que el de las células somáticas. Además, presentan marcadores de la superficie celular presentes en líneas celulares ES de otros organismos, como son (SSEA)-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 y fosfato alcalino (Thomson, J., 1998).

A pesar de que las células entre ratones y humanos comparten la expresión de la red transcripcional de la pluripotencia (*Oct3/4*, *Sox2* y *Nanog*) existen diferencias importantes

en los blancos de *Oct3/4*, *Sox2* y *Nanog*. Existe divergencia en los transcriptomas de ambas especies, los cuales se relacionan con diferencias en los requerimientos de la citosina y del factor de crecimiento. Por ejemplo, las células madre embrionarias humanas no tienen transcritos de la red de señalización LIF mientras que ésta es activa y necesaria en las células madre embrionarias de ratón. Los marcadores de la superficie celular antes mencionados (SSEA1, SSEA3 y SSEA4) también son diferentes entre ratones y humanos. Las diferencias reflejan programas transcripcionales específicos para cada especie; por tanto, existe evidencia de que las rutas de ambas especies están conservadas pero también muestran divergencia, y cada una actúa de manera diferente para regular la autorenovación y la pluripotencia. Esto significa que aunque las células de ratón sean un muy buen modelo para estudiar procesos de desarrollo, se debe tener cuidado cuando se extrapolan los resultados a células humanas (Grskovic, M. y Rmalho-Santos, M. 2008).

La expresión genética heterogénea es una propiedad recurrente de las células madre que sustenta su potencia y plasticidad en el desarrollo. Por tanto, son un modelo eficiente para estudiar la heterogeneidad de la expresión genética (Navarro, P. *et al.* 2012). Sin embargo, la expresión genética de las células madre embrionarias pueden ser producto de eventos estocásticos o de un mecanismo aún no definido, por lo que existe la posibilidad de que sólo un grupo de células se mantengan pluripotentes (Grskovic, M. y Rmalho-Santos, M. 2008).

Las células de un organismo adulto surgen de una serie de pasos secuenciales que, se creía, eran irreversibles. Con las iPS, este paradigma cambió. Cuando una célula de un tipo puede ser convertida en otro, recibe el nombre de reprogramación celular o reprogramación del linaje²⁰ (Zhou, Q. *et al.* 2008). Una hipótesis que plantea Q. Zhou es que en el futuro será posible convertir un tipo celular en otro directamente, sin la necesidad de primero revertir la célula a un estado indiferenciado pluripotente.

Los genes específicos de células madre embrionarias son más susceptibles a la generación subsecuente de pseudogenes que los genes de células somáticas. Esto es importante porque se sabe que la retrotranscripción está correlacionada con la evolución genómica. La generación de nuevos genes con nuevas funciones surge por este fenómeno y

²⁰ El autor menciona que también pueden llamarse transdiferenciación, dediferenciación o transdeterminación.

por los rearrreglos cromosómicos. La implicación de la retrotranposición de genes como *Nanog*, *Oct5* y *Stella*, en un contexto evolutivo, es una noción atractiva ya que su estudio completo revelará qué mecanismo evolutivo está operando (Pain, D. *et al.* 2005).

Un dato importante es la cantidad de células necesarias para regenerar algún tejido. Un humano adulto tiene 1×10^{15} células mientras que el hígado contiene 1×10^{14} células. Para crear este número de células se necesitaría una enorme cantidad de células de la piel. Pero algunas partes del cuerpo necesitan menos número de células para mejorar su función, por ejemplo la retina del ojo humano, que con sólo 10^5 células podría tener una recuperación terapéutica (Gurdon, J. y Melton, D. 2008).

Además, se ha visto que las diferencias en patrones de expresión genética entre células madre embrionarias sugiere que éstas no son una población homogénea y que tienen diferentes tipos o estados celulares. Esto se suma al hecho de que se necesite un gran número de células que contrarresten las diferencias genéticas. Por ejemplo, se ha visto que *Nanog* es indetectable en una subpoblación de células madre embrionarias, lo que significa que están predispuestas a diferenciarse pero se mantienen indiferenciadas. De hecho, se dice que éstas células existen un estado metaestable que fluctúa entre la estabilización de *Nanog*, *Oct3/4* y *Sox2*, mientras que la transcripción asociada a la diferenciación se mantiene en umbrales bajos, y con un estado deficiente de *Nanog* (Grskovic, M. y Rmalho-Santos, M. 2008).

4.1.2 Respuesta inmune

La terapia basada en células madre embrionarias es complicado por el rechazo inmune debido a la incompatibilidad inmunológica entre el paciente y el donador de células (Hanna, J. *et al.* 2007). Por esto, una de las ventajas de las iPS sobre las anteriores tiene que ver con esta respuesta inmune ya que el donador y el paciente son los mismos. Sin embargo, la reprogramación parcial y la inestabilidad genética y epigenética de las iPS puede provocar respuestas inmunes en los que las reciben, incluso cuando ya están diferenciadas (Araki, R. *et al.* 2013). La resistencia inmune de las iPS aún no ha sido “vigorosamente examinada” (Zhao, T. 2011) pues hasta ahora se ha asumido que estas células deben ser inmunológicamente toleradas por el que las recibe, ya que este mismo paciente donó las células para su transformación. Hasta ahora se ha visto que la expresión

genética anormal en algunas células diferenciadas provenientes de iPS pueden desarrollar una respuesta inmune. Por tal motivo, la inmugeneidad de éstas células debe ser evaluada antes de una aplicación clínica en los pacientes (Zhao, T. 2011). Los autores de este trabajo mencionan que las técnicas actuales deben ser trabajadas y optimizadas para minimizar las diferencias entre las células iPS y las células madre embrionarias. Además de que varios experimentos de trasplantes han sido realizados utilizando tejidos provenientes de iPS diferenciadas, no se ha observado rechazos. De hecho, recientemente se demostró que la inmunogeneidad de las células diferenciadas derivadas de iPS es indistinguible de las células derivadas de células madre; los autores destacan que existe la posibilidad de que las células diferenciadas provenientes de iPS presenten alguna respuesta inmune (Araki, R. *et al.* 2013).

4.1.3 Determinismo genético

Entender la pluripotencia a un nivel molecular debe iluminar las propiedades fundamentales de las células madre y el proceso de la reprogramación celular (Wang, J. *et al.* 2006). Las teorías clásicas de evolución molecular en animales, comenzaron con la comparación de aminoácidos de proteínas o las secuencias de RNA o DNA. Sin embargo, el creciente conocimiento de secuencias no-codificantes y la súper estructura de las redes genéticas del desarrollo indica aspectos importantes de las bases genómicas de la evolución de los organismos (Kamachi, Y. *et al.* 2009).

Anteriormente se creía que las redes genéticas están jerarquizadas en capas. Las capas más altas partían al embrión en grandes áreas y controlaban los genes río abajo, subdividiendo al embrión en áreas cada vez más pequeñas. Sin embargo, la red genética del desarrollo no es jerarquizada. La crítica a esta visión recae en que esta idea no incorpora mecanismos morfogenéticos ni explican cómo es que la morfología cambia durante el desarrollo. Al contrario, asumen que los mecanismos morfogenéticos se subordinan a los eventos de señalización celular.

Desde que el estudio de los mecanismos del desarrollo en especies ha modificado el modelo, las aproximaciones son difíciles. Saber cómo sucede durante la evolución es aún más difícil. Sin embargo, existe un grupo de investigadores que consideran que el entendimiento del desarrollo no es crucial para entender la evolución.

Afortunadamente, muchos de los investigadores en evo-devo han mostrado que los genes homólogos y las interacciones genéticas están generalmente involucradas en la producción de órganos similares o no, en especies relacionadas lejanamente. Otros argumentan que algunos principios generales acerca de la influencia del desarrollo en la evolución y acerca de la evolución del desarrollo es posible. Por ejemplo, dicen que el desarrollo puede cambiar en el tiempo y por mutación para producir variación en el que las características coevolucionarán. El paradigma no-seleccionista también es común pues la dinámica del desarrollo, al determinar qué variación fenotípica surge de variaciones específicas genéticas y ambientales, ha sido propuesto como un factor que junto con la selección natural, determina la dirección del cambio evolutivo.

También, ha sido propuesto que hay un número limitado de caminos por los cuales los genes se pueden conectar en redes regulatorias y así regular comportamiento celular para dar lugar a formación de patrones y morfogénesis en el desarrollo. Los mecanismos por los cuales la información genética resulta en fenotipos determina qué variación fenotípica es producida por variación genética y ambiental. Es decir que el desarrollo, produce tipos específicos de variación fenotípica en cada generación.

En esencia, el desarrollo puede ser visto como un proceso en el cual la información genética almacenada a nivel de DNA y epigenéticamente, es utilizado para transformar una distribución espacial de unos tipos celulares en otras distribuciones espaciales, a menudo más complejas. Por tanto, el desarrollo a este nivel es un proceso de generación de información espacial, desde información genética y epigenética (presente en el embrión o en el oocito) y las interacciones entre estos dos con el ambiente. Por tanto, la interacción de la genética con la epigenética no se puede reducir a estos dos factores. La epigenética necesita ser considerada para un entendimiento global de la secuencia del desarrollo y para estudios que intentan entender los cambios en el desarrollo (Salazar-Ciudad, I. 2009), una cosa que no ha sido considerada en los estudios de Yamanaka y colegas.

Se ha demostrado que diferentes mecanismos de desarrollo dan como resultado morfologías similares en diferentes especies pero también se sabe que un mecanismo de desarrollo no siempre produce el mismo patrón. El rango de transformaciones del patrón que un mecanismo del desarrollo puede producir depende de 1) el patrón inicial sobre el

que actúan los mecanismos del desarrollo, 2) el ambiente, 3) factores epigenéticos y 4) variación genética, que afecta la intensidad por la que los genes interactúan.

Los mecanismos de desarrollo pueden ser divididos en tres categorías (Salazar-Ciudad, I. 2009):

- Mecanismos autónomos
- Mecanismos inductivos: Las transformaciones ocurren por la señal de las células entre ellas.
- Mecanismos morfogénicos: la transformación ocurre sin señalización entre células.

Los estudios realizados por Yamanaka y colegas no toman en cuenta las condiciones ambientales, es decir, no se considera a la casualidad como un factor decisivo en la transformación celular. Dado que se trata de entidades biológicas, el que se pase este hecho por alto es alarmante.

Sumado a todo lo anterior, está la evidencia de que las redes regulatorias funcionan de una manera estocástica, lo que escapa de la regulación transcripcional determinista. Por tanto, es necesario tomar en cuenta y caracterizar los transcritos nuevos en las células madre embrionarias y conocer cuál es su papel en la regulación de la pluripotencia. Los resultados del estudio del transcriptoma deberán ser completados con análisis del proteoma y RNAoma, todo esto para que su papel en la modulación de la red regulatoria transcripcional sea más congruente e incluyente. Estos estudios, además, deberán ser probados *in vivo*, para cada especie, en líneas germinales y en desarrollo de tumores. (Grskovic, M. y Rmalho-Santos, M. 2008).

4.1.4 Regulación

Epigenética

La epigenética son todos los aspectos del fenotipo del embrión además de su genotipo (Salazar-Ciudad, I. 2009). El estudio de las marcas epigenéticas es un campo relativamente novedoso. De hecho, existe una fuerte evidencia de la importancia de la regulación epigenética en el mantenimiento de la pluripotencia y el proceso de reprogramación (Watanabe, A. *et al.* 2012). Además, se ha encontrado, entre muchas cosas, que un gran porcentaje del material genético está relacionado con la regulación. Esto es

relevante en tanto que es la regulación la que determina el estado pluripotente o diferenciado de la célula.

La reprogramación es el proceso contrario a la diferenciación y ambos procesos celulares están acompañados de cambios drásticos en los perfiles epigenéticos. La baja eficiencia observada en la reprogramación de las iPS en el trabajo de Yamanaka y colegas se debe a que este proceso es, desde la metáfora de Conrad Hal Waddington²¹ (1905-1975), similar a escalar una montaña debido a que es más difícil comparado con la posibilidad de alcanzar el estado diferenciado, el cual es espontáneo, igual que bajar una colina (Watanabe, A. *et al.* 2012). La examinación minuciosa de cada una de las partes que conforman a la regulación epigenética durante el proceso de reprogramación es necesaria para dar una descripción de cómo las células alcanzan su destino diferenciado a través de moléculas clave.

La pluripotencia inducida es un proceso asociado con cambios epigenéticos graduales y puede ser explotada para obtener un entendimiento molecular de la determinación del destino celular, el cual está mediado por cambios epigenéticos como el silenciamiento de transgenes retrovirales, la reactivación de genes endógenos de pluripotencia, el establecimiento de dominios bivalentes en promotores de genes regulados en el desarrollo, hipometilación global del DNA, hipermetilación de genes impronta, reactivación del cromosoma X inactivo en las células femeninas iPS y la reorganización de las fibras de la cromatina (Watanabe, A. *et al.* 2012).

N. Maherali y colaboradores (2007) se preguntaron si las células iPS que lograron transformar adquirieron un estado similar al de las células madre embrionarias. La reprogramación del genoma somático por transferencia nuclear o fusión celular está acompañado por cambios epigenéticos como la desmetilación de genes pluripotentes en sus regiones promotoras. Varios resultados surgieron de esta pregunta (Maherali, N. *et al.* 2007):

- Las células femeninas, en contraste con las células madre embrionarias masculinas, mostraron una hipometilación global del DNA, lo que es atribuible a la presencia de

²¹ El modelo de Waddington describe cómo es que las células diferenciadas adquieren su identidad celular en tanto que el potencial de desarrollo de una célula continua hacia un estado terminal diferenciado. En la metáfora de Waddington, las células son como mármoles que ruedan hacia debajo de una colina, con el potencial de desarrollo bajando hacia la diferenciación, en la elevación más baja, un valle.

los cromosomas X activos. Esto sugiere que las células iPS obtuvieron un estado epigenético similar al de las células ES femeninas.

- La inactivación del cromosoma en las iPS femeninas muestra la misma dinámica que sus equivalentes células madre embrionarias.
- La inactivación azarosa de X confirma que las marcas epigenéticas pueden ser removidas en reprogramación *in vitro* y reestablecidas en la diferenciación *in vitro*.
- Para saber si además de la desmetilación de los promotores de *Oct3/4* y de *Nanog* y la reactivación del cromosoma X, el genoma del fibroblasto se reprogramaba epigenéticamente a un estado similar a las células ES durante la derivación a célula iPS. Los genes que se transcriben están asociados como la trimetilación H3K4 mientras que los silenciados están asociados con la trimetilación de H3K27. Como resultado, observaron que las diferencias en la expresión de genes de células madre embrionarias, iPS se correlaciona con las diferencias observadas en los patrones de metilación de las histonas, lo que sugiere que la metilación de K4 y K27 son determinantes importantes para el estado de expresión de estos genes. Estos datos demuestran que la reprogramación nuclear por cuatro factores de transcripción pueden inducir la transcripción global y el reseteo epigenético del genoma.
- La expresión transgénica de *Oct3/4* no es necesaria para el mantenimiento de células iPS. Esto indica que el programa de expresión endógena de genes fue suficiente reactivada para asegurar el mantenimiento de la pluripotencia.
- La reprogramación epigenética anormal no debería comprometer la utilidad terapéutica de células directamente reprogramadas.

Existe una profunda diferencia en las habilidades de reprogramación entre las células ESC y las somáticas. Mientras la habilidad para reprogramar *trans* en presencia de las células somáticas y células madre embrionarias, éstas últimas poseen la capacidad para reprogramarse de manera *cis* en todo el genoma, lo cual está ausente en las células somáticas (Foshay, K. *et al.* 2012). La preprogramación de la pluripotencia ocurre de forma rápida en *trans* pero lentamente en *cis*. La reprogramación *cis*, pero no la *trans*, es dependiente de la división celular.

Además, se ha visto que cuando hay un aumento en la transcripción global en las células madre embrionarias, está en coordinación con características específicas de la

cromatina de estas células, como es una estructura de la cromatina más laxa, con altos niveles de H3K9 acetiladas y H3K4 metiladas y con la presencia de marcas bivalentes (Grskovic, M. y Rmalho-Santos, M. 2008)..

Los estudios epigenéticos deben ser uno de los objetos de estudio más importante en la reprogramación celular por representar una fuente de suma importancia de casualidad en este fenómeno biológico. Gran parte de la baja eficiencia de la reprogramación o de que una vez transformadas, se conviertan en células tumorales es atribuible al factor epigenético.

Factores de transcripción

La clasificación más común de los factores de transcripción está basado en la estructura de los dominios de unión al DNA (Fig. 22). En algunas instancias, estos dominios dan pistas de su función. Por ejemplo, los TFs de los homeodominios están asociados con procesos del desarrollo (Vaquerizas, J. *et al.* 2009). Desde un enfoque mecanístico, el efecto de un solo factor de transcripción es amplificado al transcribir muchas copias de RNAm de un gen blanco. Más aún, es sencillo desencadenar un evento regulatorio al alterar las concentraciones o si la actividad de su nivel de expresión se mantienen bajos, ya que esto permite a los TFs unirse a los sitios con una afinidad alta.

La función y la organización genómica de los genes está íntimamente conectada con la manera en que han evolucionado. De hecho, la proliferación de nuevos genes regulatorios coincide con la emergencia del aumento de la complejidad del organismo, y esto les permite desarrollar nuevas funcionalidades. La familia de TFs relacionadas con el homeodominio apareció durante el surgimiento de los planes corporales de los animales; primero apareció en los organismos metazoarios y se expandió rápidamente en los vertebrados. Se ha hipotetizado que muchas adaptaciones humanas se deben a cambios en la regulación genética, sin embargo, poco se sabe acerca de la manera en que la selección natural actúa en la regulación en primates (Gilad, Y. *et al.* 2006).

Esto es congruente con el hecho de que las agrupaciones de genes basadas en combinaciones de factores de transcripción tienen el potencial de dar información para la predicción de la expresión de genes específicos de células madre embrionarias. Un ejemplo de esto es lo que menciona M. Grskovic y M. Rmalho-Santos (2008), pues se encontró que

la mayoría de los genes regulados en las células madre embrionarias están asociados con *Nanog*, *Oct3/4*, *Sox2*, *Smad1* y *STAT3* o *c-Myc* y *n-Myc* (Grskovic, M. y Rmalho-Santos, M. 2008).

Existen agrupaciones de genes parálogos, como receptores olfativos e inmunes, que surgen de duplicaciones a larga escala dentro de los cromosomas. Por ejemplo, existen agrupaciones de genes homeóticos en los cromosomas 2, 7, 12 y 17. Una explicación para esto es que cada región debe ser expresada en una manera coordinada muy precisa, y el arreglo en agrupación les permite ser controlados por un solo *enhancer*, común y distal.

En el futuro, será posible predecir cómo las acciones de diferentes reguladores da diferentes soluciones y aplicar estas predicciones en la clínica, como direccionar el progreso de diferenciación de células madre. A penas estamos comenzando a entender qué hacen los TFs en humanos (Vaquerizas, J. *et al.* 2009).

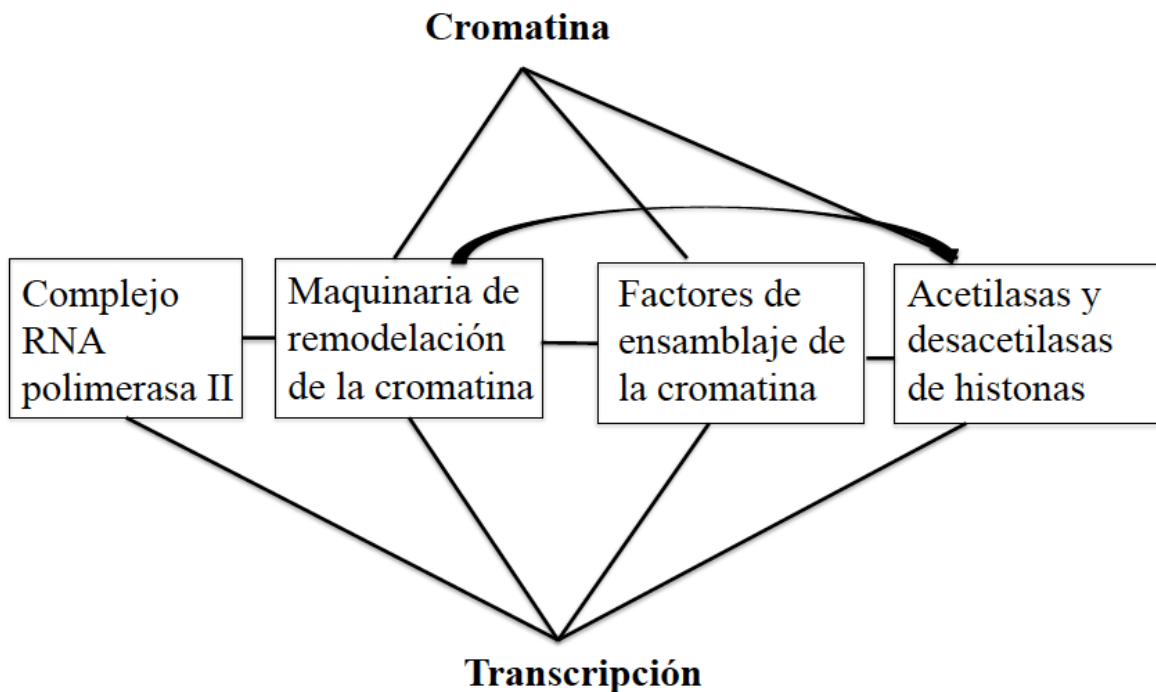


Figura 22. Diagrama esquemático de los enlaces potenciales entre la cromatina y la transcripción. La transcripción eucarionte es una red entrelazada de factores de transcripción y los complejos modificadores de la cromatina (Fuente: Kadonaga, J. 1998).

Como ya vimos en el capítulo 1, los factores de transcripción regulan una gran cantidad de genes. El hecho de que Yamanaka y sus colegas emplearan cuatro factores de

transcripción es la piedra angular de su investigación y tiene una implicación evolutiva importante.

En primer lugar, significa que estos cuatro factores no sólo se regulan a si mismo y a las funciones propias, sino que además, regulan a más genes. Esto significa que el que Yamanaka y sus colegas hayan encontrado cuatro factores, no implica que sean los únicos cuatro factores esenciales en la reprogramación.

En segundo lugar, el que sean factores de transcripción hace evidente la existencia de redes genéticas regulatorias que determinan numerosas funciones celulares.

En tercer lugar, este resultado resalta la importancia de tomar en cuenta que el estudio de las partes (desde un enfoque mecanístico) no es la mejor aproximación para el estudio de sistemas complejos, en este caso, organismos. Se debe tomar en cuenta que cada componente celular, desde la molécula más pequeña hasta el sistema completo, son parte de una red de interacciones complejas. Además, éstos se encuentran en constante interacción con factores ambientales que hacen difícil la predicción de los resultados. Todo esto se entiende mejor al estudiar las redes regulatorias, de las que los cuatro factores que Yamanaka y sus colegas encontraron, forman parte.

Redes regulatorias

Las proteínas que se unen a secuencias determinadas de DNA son el mecanismo primario por el cual las células interpretan el genoma. Un paisaje complejo de unión con el DNA es importante en la regulación genética y en la evolución de las redes regulatorias de transcripción (Badis, G. *et al.* 2009).

Los transcriptomas de diferentes líneas de células madre embrionarias han sido analizados para identificar los mecanismos en el control de la autorenovación y la pluripotencia. Estos estudios han comenzado a revelar los componentes de la arquitectura de las redes regulatorias transcripcionales y sugieren que los factores de transcripción mantienen el estado pluripotente en la cromatina accesible. Esta cromatina permite el aumento de la transcripción global, resultando en la expresión de muchos transcritos nuevos y las fluctuaciones alteran las posibilidades de convertirse en células diferenciadas o que se autorenewan (Grskovic, M. y Ramalho-Santos, M. 2008).

Las interacciones regulatorias entre los factores de transcripción y sus genes blanco puede ser entendido de la siguiente manera: a un nivel global, estas redes regulatorias exhiben una topología sin escala, lo que indica la presencia de ejes regulatorios. A un nivel local, las subestructuras, como los motivos y los módulos, pueden ser discernidos en estas redes (Fig. 23).

Para aumentar la red regulatoria transcripcional, M, Grskovic, M. y M. Rmalho-Santos (2008), mencionan que se ha de examinar la función de seis factores de transcripción en células madre embrionarias, que incluyen a *Klf4* y a *c-Myc*. Con esto se demostró que la regulación de genes blanco se correlaciona con el grado de la ocupación del promotor por múltiples factores. Es decir que los promotores unidos por algunos factores tienden a ser preservados, mientras que los promotores unidos a más de cuatro factores están ampliamente activos en el estado pluripotente y se reprimen en tanto se diferencian las células.

A pesar de la similitud general organizacional de las redes a lo largo del espectro filogenético, hay diferencias cualitativas entre los componentes de la red, como los factores de transcripción. A pesar de que la unión de dominios de DNA de los factores de transcripción codificados por ciertos organismos están dados por un pequeño grupo de superfamilias conservadas, su relativa abundancia muestra variación entre los diferentes grupos filogenéticos. Porciones grandes de estas redes parecen haber evolucionado a través de una duplicación extensiva de factores de transcripción, por lo general con herencia de interacciones regulatorias de genes ancestrales. Las interacciones están conservadas en varios grados entre genomas. Pistas de la estructura y evolución de estas redes puede ser traducido en predicciones y usos para ingeniería de redes regulatorias de diferentes organismos (Babu, M. *et al.* 2004).

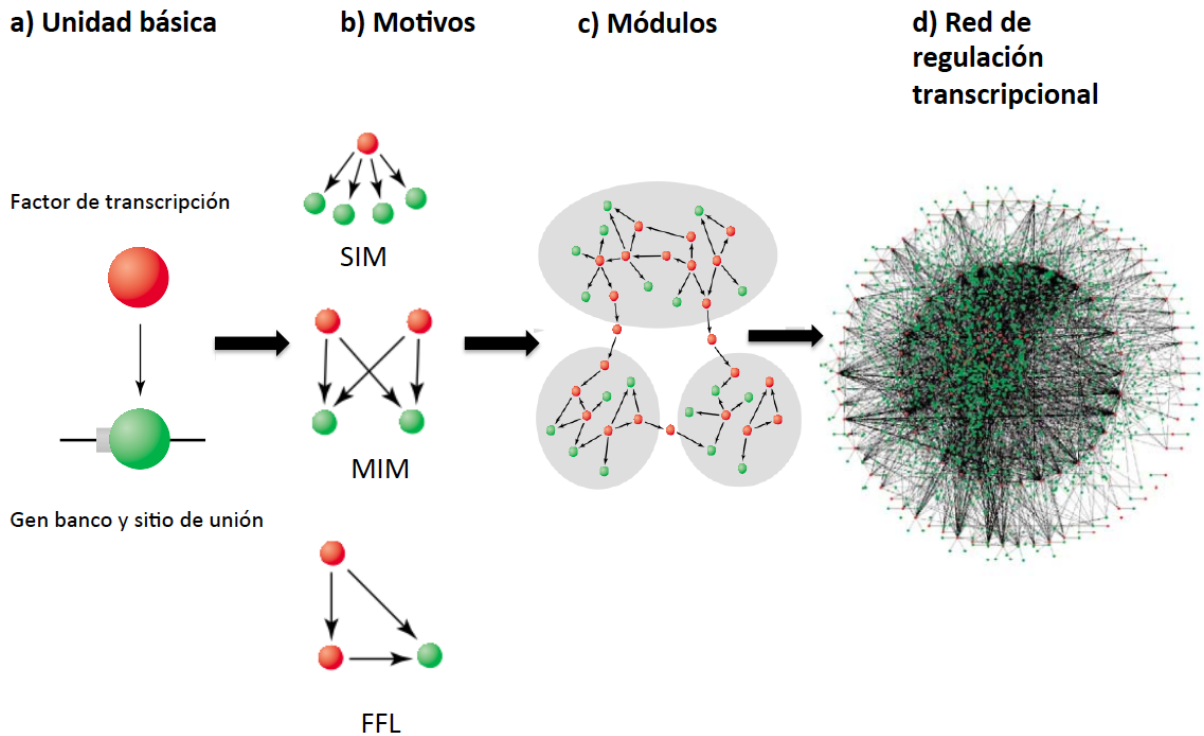


Imagen 21. Organización estructural de las redes regulatorias transcripcionales. El arreglo de interacciones regulatorias junto con factores de transcripción a sus genes blanco en un organismo pueden ser vistos como una gráfica donde los reguladores y los blancos son nodos y la interacción regulatoria son los ejes. La red resultante es una compleja red, un sistema de múltiples capas que puede ser examinado en cuatro niveles. a) la unidad básica contempla al factor de transcripción, el gen blanco con su sitio de unión en el DNA, y la interacción regulatoria entre ellos. b) En el segundo nivel, las unidades básicas están organizadas en patrones de interconexiones llamadas *motivos de red*, las cuales contemplan patrones específicos de inter-regulación que se sobre representan en las redes. Ejemplos de esto son las entradas únicas (SIM, por los vocablos en inglés *single input*), entradas múltiples (MIM, por los vocablos en inglés *multiple input*) y un circuito de prealimentación (FFL, por los vocablos en inglés *feed-forward loop*). c) En el tercer nivel, las agrupaciones de motivos se interconectan para formar *módulos* semiindependientes; muchos de éstos han sido identificados por datos de interacción en las regulación con datos de expresión genética. Esto habla de una conservación evolutiva. d) la unión de todas las interacciones regulatorias constituye la red de regulación transcripcional, la cual es la huella digital para la regulación de la expresión genética en un organismo (Fuente: Babu, M. *et al.* 2004).

Niveles de la red regulatoria (Babu, M. *et al.* 2004):

- **Motivos:** a un nivel local, la red transcripcional se puede separar en una serie de motivos regulatorios, que representan las unidades más simples de la arquitectura de la red. Aquí hay patrones específicos de inter-regulación entre factores de transcripción y genes blanco. Los motivos no representan unidades independientes que estén funcionalmente separados del resto de la red.
- **Módulos:** la organización de la red regulatoria puede ser entendida como un nivel intermedio en esta modularidad. Las redes regulatorias tienden ser más interconectadas y pocos módulos son totalmente separables del resto de la red. De hecho, muchos módulos están unidos entre ellos en una organización jerárquica a diferentes niveles de conectividad. Los módulos están interconectados a través de ejes locales regulatorios. Dicha organización combina la capacidad de cambios regulatorios rápidos a través de ejes regulatorios con la integración de procesos regulatorios a lo largo de diferentes módulos.
- **Organización de red global:** La estructura general o la topología de una red genética regulatoria puede ser descrita por parámetros derivados de la teoría de gráficas. La conectividad es el número de factores de transcripción regulando genes blanco, la cual cuantifica el efecto combinatorio de la regulación genética. Aquí, la fracción de genes blanco con una conectividad dada disminuye exponencialmente, lo que indica que muchos genes blanco están siendo regulados por un número similar de factores y refleja los límites moleculares en el número de factores de transcripción que pueden afectar un gen blanco simultáneamente.

Las redes regulatorias genéticas de un organismo son una entidad dinámica y diferentes secciones de la red estará activa bajo diferentes circunstancias. En momentos donde la célula responde rápidamente a cambios en condiciones externas, la topología de la red es simple, con pocas cascadas de factores de transcripción. En procesos con múltiples estados, como el ciclo celular, ocurre lo contrario, probablemente debido a procesos

regulatorios complejos son necesarios para llevar a la célula a través de fases sencuenciales (Babu, M. *et al.* 2004).

En contraste con el alto nivel de conservación de sistemas regulatorios y de señalización a lo largo del grupo de los eucariontes, algunas de las familias de factores de transcripción son dramáticamente diferentes en varios linajes. Esto sugiere que un gran papel para la expansión de linajes específicos en la evolución de factores de transcripción en el grupo de los eucariontes (Babu, M. *et al.* 2004). Este grado de conservación hace que sea posible identificar desde estudios computacionales, factores de transcripción nuevos, utilizando sólo datos de expresión genética (Grskovic, M. y Rmalho-Santos, M. 2008).

El efecto de la duplicación genética en la estructura de la red regulatoria transcripcional se puede entender desde tres escenarios: duplicación de los factores de transcripción, duplicación de los genes blanco con su región regulatoria y la duplicación del factor y del blanco. Posterior a la duplicación de los factores de transcripción, ambas copias del factor regularán los mismos genes blanco, hasta que las interacciones regulatorias estén gradualmente ganadas o perdidas. Después de la duplicación de los genes blanco, ambas copias serán reguladas por el mismo grupo de factores de transcripción.

Es evidente que los genes y las interacciones regulatorios están conservadas por los grados en organismos relacionados y esto puede ser explotado para reconstruir las redes regulatorias para caracterizar a los organismos. Las pistas en la estructura de las redes regulatorias y su evolución pueden ser traducidas en la predicción de factores de transcripción y la ingeniería de sus interacciones regulatorias. (Babu, M. *et al.* 2004).

Un número relativamente pequeño de proteínas regulatorias lleva a cabo múltiples funciones para coordinar el desarrollo de un animal. Muchas de las proteínas regulatorias son factores de transcripción que afectan la expresión de genes y que interactúan con otras proteínas en el núcleo para regular la expresión de sus genes blanco. La pérdida de la función por mutaciones en los genes que codifican para grandes reguladores del desarrollo es letal en los primeros estadios del desarrollo mientras que son necesarias las moléculas reguladoras. Las proteínas regulatorias tienen secuencias y funciones altamente conservadas en organismos como ratones y gusanos. Los genes nuevos no hacen diferentes a los organismos entre ellos, de hecho, la diferencia entre especies radica en la función de sus secuencias reguladoras que determinan el tiempo y el patrón de la expresión genética.

Estos patrones de expresión genética define la diversidad de funciones celulares durante el desarrollo, lo que permite a través de la expresión de genes regulatorios y de mecanismos epigenéticos, un refinamiento futuro en las rutas de desarrollo en cada organismo.

Por tanto, la expresión regulada de un gen es una consecuencia de un fino balance entre dos componentes: 1) Factores *trans* y 2) los blancos de los factores anteriores o de regulación *cis* que responda a los *trans* al permitir la expresión represiva de los genes. Es decir que los factores de transcripción específicos al código combinatorio de los elementos regulatorios *cis* activa o reprime genes blanco (Guruharsha, K. y Vijayraghavan, K. 2004). En el caso de las células madre embrionarias, se ha encontrado motivos de DNA que están bien representados en las regiones *cis* de los genes con una alta expresión. Estos motivos incluyen sitios de unión para los factores de transcripción *Oct3/4*, *Sox2* y *c-Myc*, además para otros motivos nuevos. Por tanto, es importante tener estudios de perfiles genéticos imparciales para obtener una descripción más comprensiva del transcriptoma pluripotente (Grskovic, M. y Rmalho-Santos, M. 2008).

Los cambios en los patrones de expresión genética generan muchas de las diferencias fenotípicas entre las especies. Aunque se ha puesto mucho énfasis en los cambios en la regulación transcripcional, la expresión genética está regulada en muchos niveles. Todos deben ser estudiados para obtener una imagen completa de la evolución de la expresión genética (Chen, K. y Rajewsky, N. 2007).

La emergencia de organismos complejos y multicelulares estuvo acompañado y, probablemente facilitado, por aumentos dramáticos en la complejidad de mecanismos de genes regulatorios. A un nivel de regulación transcripcional, esto puede ser visto en la expansión masiva de familias de factores de transcripción (Chen, K. y Rajewsky, N. 2007).

Además, al comparar el transcriptoma de una célula madre embrionaria con una diferenciada, se puede encontrar una hipertranscripción en las primeras, que incluye la expresión de regiones no codificantes que normalmente están silenciadas. Además, muchos genes tejido-específico están expresados a bajos niveles en las células madre embrionarias, lo que sugiere que su expresión puede ocurrir de manera estocástica en la población. Sin embargo, no se sabe si esta hipertranscripción es una consecuencia de las propiedades de la cromatina de las células madre embrionarias o si tiene un papel relevante en la regulación de la pluripotencia y autorenovación de éstas. (Grskovic, M. y Rmalho-Santos, M. 2008).

A pesar de que los factores de transcripción y los miRNAs son dos de los mecanismos regulatorios mejor estudiados, hay otros como son la señalización celular, el splicing de RNAm, modificación de cromatina y mecanismos de localización, modificación y degradación de proteínas (Chen, K. y Rajewsky, N. 2007).

En organismos multicelulares, los factores de transcripción generalmente no trabajan aisladamente pero junto con co-reguladores, forman largas redes de factores de transcripción que cooperan e interactúan.

J. Gurdon y D. Melton (2008) propusieron que la combinación de puntos de unión del DNA o proteínas cromosómicas se asocian fuertemente con las regiones regulatorias de genes inactivos después de la reprogramación celular. De acuerdo con esto, la probabilidad de reprogramar con la transferencia nuclear, fusión celular, iPS y experimentos de cambio de linaje dependerá de la frecuencia del acceso estadístico de regiones regulatorias genéticas junto con la duración y la concentración de factores de transcripción y otros reguladores.

Uno de los objetivos más importantes para el futuro es dilucidar cómo es que las redes regulatorias genéticas complejas han evolucionado y cómo es que su evolución resulta en cambios fenotípicos y especiación (Chen, K. y Rajewsky, N. 2007).

Debido a que los sitios de unión de los factores de transcripción son difíciles de predecir computacionalmente, es difícil de descifrar la dinámica global de sitios de unión de factores de transcripción se volteó sobre grandes distancias evolutivas usando métodos computacionales (Chen, K. y Rajewsky, N. 2007).

Se ha dicho que los represores han evolucionado más rápido que los activadores, ya que hay muchas maneras de reprimir un gen pero relativamente pocas para activarlo. En tanto que los factores de transcripción pueden funcionar como activadores o represores, pero todos los miRNAs conocidos funcionan como represores, uno podría esperar que los sitios de unión de los miRNAs hayan evolucionado más rápido que los sitios de unión de los factores de transcripción (Chen, K. y Rajewsky, N. 2007).

Nuestro conocimiento actual sobre cómo los factores de transcripción, miRNAs, rutas de señalización y otros reguladores están unidos en redes del desarrollo es muy rudimentario para hacer cualquier declaración acerca de los efectos de diferentes mecanismos regulatorios en la evolución de la red global (Chen, K. y Rajewsky, N. 2007).

La evolución de los mecanismos moleculares que regulan la pluripotencia no ha sido estudiado a detalle. De hecho, la secuencia y función de reguladores de pluripotencia, como *Oct3/4* y *Nanog*, no parecen estar bien conservados fuera de los mamíferos; se han identificado ortólogos de éstos dos factores en *Xenopus* y en pollos, pero están más ampliamente expresados en embriones de ratón. *Oct3/4* y *Nanog* promueve la autorenovación de células madre embrionarias en pollos, pero su función en este animal está por ser determinado.

Oct3/4 y *Nanog* se expresan en células primordiales germinales (PGCs, *primordial germ cells*) y los axolotes también contienen la expresión de *Oct3/4* en embriones en gastrulación y en oocitos (Fuellen, G. y Struckmann, S. 2010).

Es posible que el programa de pluripotencia evolucionó de mamíferos, de componentes moleculares ya presentes en otros vertebrados, para inhibir la diferenciación somática y preservar la competencia en las líneas germinales, hasta que ésta está totalmente desarrollada (Grskovic, M. y Rmalho-Santos, M. 2008).

Cáncer

La Selección Natural da pistas sobre la etiología y tratamiento del cáncer a una escala microscópica, esto es debido a que la reproducción celular con variación heredable afecta a la sobrevivencia y replicación celular (Pepper, J. *et al.* 2009).

Se sabe que muchos cánceres surgen de células madre aberrantes o de dediferenciación progresiva de sus contrapartes normales. La dediferenciación ocurre si una combinación particular de factores asociados con células madre se expresan en éstas células cancerígenas, posiblemente de una manera análoga a lo que sucede con las células iPS. Por ejemplo, la expresión ectópica de *Oct3/4* inhibe la diferenciación de las células progenitoras y causa displasia en tejido epitelial. Los blancos de *Oct3/4*, *Sox2* y *Nanog* se expresan en algunos cánceres; *c-Myc* puede activar programa transcripcional parecido al de las células madre embrionarias en epitelio adulto, e incluso induce a *Sox2* y reprime reguladores de diferenciación, como son los genes Hox.

Sumado a esto, se ha encontrado que programas transcripcionales parecidos a los de las células madre embrionarias están activos en diferentes tumores humanos y están correlacionados con metástasis y mortalidad; el programa transcripcional incluye genes del

ciclo celular, señalización, transcripción, reparación de DNA, respuesta al estrés y diferenciación.

Todo el conocimiento adquirido de la regulación de la pluripotencia facilitará la identificación de nuevos marcadores cancerígenos y blancos terapéuticos. Debido a que el cáncer implica procesos evolutivos complejos, las investigaciones deben incorporar sistemas experimentales simplificados y estudios de observación longitudinal de las dinámicas evolutivas del cáncer en animales de laboratorio y pacientes humanos. Además, la integración de la biología evolutiva en el estudio de la biología del cáncer permitirá predecir su progresión y prevenir la resistencia terapéutica adquirida (Pepper, J. *et al.* 2009).

4.2 Futuro

El futuro de la reprogramación celular es tan grande como la necesidad de continuar estudiando esta tecnología, pues como se vio a lo largo de este capítulo, son muchos factores que no se toman en cuenta en el desarrollo de esta tecnología. Los alcances terapéuticos y de investigación científica repercutirá en la sociedad, con mejoras en la calidad de vida, por ejemplo, o en las modificaciones en la conducta y en la manera en que se aprecian los avances en terapia génica; en la política, pues tendrá que haber reformas en las leyes; en la economía impactará por la inversión en estos estudios, por la generación de empresas y la movilidad de capital monetario; en la ética, por las puertas que abren sobre el uso de células humanas y su transformación para la mejora en la calidad de vida.

Particular y específicamente, el futuro de las células reprogramadas va en dos sentidos. El primero es crear líneas celulares que duren mucho tiempo provenientes de pacientes con enfermedades genéticas con la finalidad de probar medicamentos u otros tratamientos. El segundo es proveer células de remplazo para pacientes. En este caso, las células de remplazo necesitarán ser un numero suficiente, llevar a cabo su función incluso si no están totalmente integradas a los tejidos y ser capaces de producir una buena cantidad del producto que realicen.

En el futuro existirán rutas alternativas para el reemplazo de células. Una es evitar la necesidad de transfectar genes a las células si se encuentra la combinación correcta de pequeñas moléculas que puedan entrar a las células. También será fructífero encontrar

poblaciones de células que se dividan naturalmente en órganos adultos para que éstas, en su estado menos especializado, se puedan expandir y diferenciar en cultivo antes de la implantación. También se podría buscar la unipotencia o la oligopotencia antes que la pluripotencia o la totipotencia, ya que esto es más seguro y útil desde un punto de vista terapéutico (Gurdon, J. y Melton, D. 2008).

Un entendimiento detallado de la expresión genética en células pluripotentes continuará haciendo contribuciones importantes para el desarrollo, las células madre y el cáncer. Con los estudios, se observa que el modelo es una imagen donde los factores transcripcionales, que operan a través de mecanismos autoregulados, mantienen la pluripotencia gracias a una cromatina abierta, accesible. Las fluctuaciones en las redes regulatorias transcripcionales causan que las células madre embrionarias pasen por diferentes estados con propensión a la autorenovación y a la diferenciación. Se deben estudiar la probabilidad de la pluripotencia en las células madre embrionarias, y cómo esto puede ser modulado; dilucidar estos mecanismos debe ser un objetivo que lleve al fondo del asunto para tener un entendimiento de la embriogénesis y el desarrollo de las líneas germinales (Grskovic, M. y Rmalho-Santos, M. 2008).

4.3 Los genes *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4* como modelo explicativo

Desde el punto de vista de evo-devo, las transformaciones morfológicas evolutivas son resultado de cambios en la genética del desarrollo heredados de generación en generación. Uno de los objetivos de investigación es dilucidar el cambio de forma al identificar mecanismos del desarrollo, como puede ser la diferenciación de linajes celulares. Los factores de transcripción con los que Yamanaka y colegas trabajaron tienen papeles esenciales en el desarrollo temprano de muchos animales, y son necesarios para la propagación de células madre embrionarias en cultivo. Más aún, son centrales para la regulación transcripcional, la cual especifica la identidad de las células madre embrionarias debido a un patrón único de expresión. El que *Oct3/4* sea el único gen de los cuatro relacionado con el mantenimiento del estado pluripotente (aunque *Sox2* tiene ambos papeles, tanto de diferenciación celular como de mantenimiento de pluripotencia) y que los

demás se desempeñan en la regulación de otros genes durante el desarrollo habla de un mecanismo de acción en el desarrollo a través de redes de activación y represión.

Oct3/4, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* y *Nanog*²² son reguladores esenciales en el desarrollo embrionario temprano y en la identidad de las células madre, en tanto que son factores de transcripción con homeodominios conservados a lo largo de la evolución, y que juegan papeles sustanciales en la especificación del destino celular de muchos organismos. Las interacciones entre los factores de transcripción y sus sitios de unión en el DNA son parte integral de las redes genéticas regulatorias que controlan el desarrollo. Además, son esenciales en procesos celulares, tanto de mantenimiento como de diferenciación, ya que aseguran la expresión de genes específicos y controlan procesos biológicos.

Dado que el objetivo de investigación de evo-devo es describir el desarrollo de las especies a través del tiempo y dar principios generales por los cuales la evolución morfológica puede ocurrir en todos los animales, estos cuatro genes son un modelo explicativo que dan información sobre la estructura de redes genéticas del desarrollo y su prevalencia a lo largo de las generaciones. Esto es importante ya que hace evidente que las redes genéticas del desarrollo operadas por genes maestros, difícilmente varían a lo largo de generaciones de la misma especie y entre linajes animales. Ejemplo de esto es que los cuatro factores con los que trabaja el grupo de investigación de Yamanaka han sido encontrados en diferentes animales, que además de los ratones, ratas y humanos, incluyen a la cabra (*Capra hircus*), a la vaca (*Bos Taurus*), el gallo (*Gallus gallus*), el gato (*Felis catus*), entre otros.

La teoría evolutiva del desarrollo puede dividirse en cinco objetos de estudio, pero esta tesis se centra en dos: la evolución del desarrollo, que es el estudio comparativo de características a diferentes niveles de la jerarquía biológica (genes, redes genéticas, patrones de expresión, etc.); y el mapa genotipo-fenotipo, que es la comprensión de la dinámica de la adaptación desde un nivel genético, es decir que las diferencias entre especies puede explicarse desde la arquitectura del desarrollo. Esto sirve para mencionar que, a pesar de que los núcleos de las redes genéticas que operan los cuatro factores de

²² Recordemos que *Nanog* resultó ser, de acuerdo a los trabajos de Yamanaka y colegas, dispensable. En otras investigaciones se ha visto que más que ser esencial para establecer la pluripotencia, refuerza el estado pluripotente, es decir, lo mantiene. Para ver esto, revisar el apartado 3.4.1, en el capítulo 3.

transcripción trabajados por Yamanaka y colegas se mantienen a lo largo de muchos linajes animales, son pequeños cambios dentro de estas redes las que dan los cambios morfológicos.

El paradigma genético de evo-devo se sostiene en tres fundamentos, todos presentes en los factores de transcripción de Yamanaka y colegas: las similitudes entre los genes regulatorios del desarrollo a través del reino animal; las modificaciones en las instrucciones genéticas, las cuales generan clados, encontradas en las diferencias de niveles y tiempos de expresión de los genes regulatorios; la variación de los genes y su expresión en las poblaciones, es decir, las variaciones fenotípicas resultadas de las mutaciones en genes regulatorios.

Evo-devo retoma la noción de que se generan cambios más evidentes cuando existen alteraciones en la regulación de los genes, más que en su estructura. El hecho de que la investigación liderada por Yamanaka se centre en genes regulatorios es el punto de encuentro entre esta tecnología y la teoría evolutiva del desarrollo. Las similitudes entre diferentes especies, como es el plan corporal, está dada por la función de las secuencias regulatorias, las cuales determinan el tiempo y el patrón de la expresión genética. Estos genes, que generan patrones corporales y que son compartidos por especies morfológicamente separadas desde hace mucho tiempo, son una evidencia de las relaciones ancestrales de todos los animales, y un punto a favor de la teoría de la evolución. La homología profunda es una evidencia de la presencia de la evolución en el proceso de desarrollo; la formación y diferenciación de numerosas estructuras entre phyla está gobernada por agrupaciones de genes que tienen circuitos genéticos regulatorios altamente conservados. Además, se ha visto que los genes más antiguos, es decir, altamente conservados, forman parte de las funciones básicas celulares, mientras que los más nuevos están asociados con tareas especializadas. Es así que se sabe que los factores de transcripción que controlan el desarrollo son más antiguos que otro tipo de reguladores.

La genética es primordial en las teorías evolutivas del desarrollo, sin embargo no explican por sí solas el surgimiento de los fenotipos; la evolución de los mecanismos de desarrollo no puede entenderse únicamente a nivel genético. Evo-devo es la suma de explicaciones genéticas, fenotípicas y los cambios que existen en una generación (desarrollo) y entre generaciones (evolución, filogenia). Por un lado está la contingencia y

los factores ambientales que seleccionan ciertas interacciones y por otro están las interacciones epigenéticas que generan fenotipos. Por ejemplo, están los cambios en la expresión espacio-temporal de los genes, los genes que son encendidos y apagados por factores de transcripción y los niveles de expresión de los genes. Todos estos eventos están mediados por fenómenos contingentes que tienen un efecto directo en la generación de cambios evolutivos en la morfología entre especies y a lo largo de linajes. Además, la expresión de un gen es consecuencia de un fino balance entre dos componentes: la expresión de los factores *trans* (factores de transcripción y proteínas regulatorias) que tienen afinidad específica para cada secuencia blanco de DNA; y el blanco de los factores *trans*, que son llamados *cis* (enhancers), mismos que responden a la activación o represión de una secuencia genética y son, además, el blanco más probable de la evolución de la regulación genética. Los cambios en la regulación espacial de la maquinaria de genes y, a su vez, los genes que éstos regulan, están asociados con divergencia morfológica; es decir que esta heterotropía es la posible razón de que, a pesar de que la red genética regulatoria está intacta transversalmente en el linaje animal, las pequeñas fluctuaciones en la expresión y en la regulación, son los responsables de las diferencias morfológicas entre especies. La reorganización, las alteraciones en la actividad y la especificidad regulatoria de factores dentro de las redes de genes regulatorios puede causar cambios evolutivos en la morfología animal, es una fuente de diversidad fenotípica y de evolución adaptativa.

Más aún, los factores de transcripción, como los cuatro utilizados en la investigación de Yamanaka y colaboradores, están presentes en los oncogenes y en un porcentaje de los desordenes del desarrollo humano. Es su falla la que promueve la aparición de cáncer o de problemas en el desarrollo.

Tomar en cuenta estos parámetros evolutivos, con marcos teóricos más incluyentes, permite generar preguntas de investigación congruentes con la filogenia de cada línea celular, con las redes genéticas y epigenéticas que regulan procesos metabólicos, y con la contingencia de cada evento celular. Esto lleva a resultados eficaces y apegados a la realidad, ya que no se cae en una concepción mecanicista ni reduccionista de fenómenos celulares y evolutivos, sino que las causalidades y casualidades son tomadas en cuenta como motores de cambio a través de generaciones y linajes enteros.

Conclusión

Los cuatro genes regulatorios trabajados por Yamanaka y colegas para desdiferenciar células epiteliales tienen importancia evolutiva en tanto que son un modelo explicativo del desarrollo, tanto en linajes celulares, relaciones dentro de las especies y a lo largo del grupo de los animales. Los cambios morfológicos a través del tiempo generados por genes que operan en el desarrollo, objeto de estudio de la teoría del desarrollo, pueden ser entendidos por la manera en que operan estos cuatro factores de transcripción, ya que son genes maestros que regulan mecanismos celulares propios del desarrollo y que dan lugar al mantenimiento de la pluripotencia, pero sobre todo, a la diferenciación.

Evo-devo se fundamenta en la conservación de redes regulatorias maestras que regulan a una gran cantidad de genes durante el desarrollo, y en que los cambios morfológicos entre especies sean resultado de factores epigenéticos y de regulación, más que en cambios en genes estructurales. Este es fundamento teórico de estos cuatro factores de transcripción trabajados por el trabajo de investigación de Yamanaka y colegas: todos están presentes en gran número de especies y todos presentan la misma función. Las diferencias morfológicas entre especies son resultado de la regulación espacio-temporal de éstos.

La teoría evolutiva del desarrollo ha subrayado el papel esencial de los factores que regulan la expresión genética, más que los mismos genes. Su discurso se ha centrado en destacar el trabajo conjunto entre genes maestros, reguladores de la expresión genética y de los genes. Han puesto énfasis en la necesidad de comprender al desarrollo como un todo, en donde los mismos reguladores son representantes de la genética del organismo, pero también de su ambiente. Han mencionado como son las redes genéticas las que se han mantenido a lo largo de la evolución, a lo largo de todo el linaje animal, y cómo las novedades que presenta cada agrupación no se dan a nivel de regulación, sino en pequeños puntos de la función estructural de algunos genes.

Por tratarse de un proceso altamente conservado en el desarrollo de los animales, es entendible que se esperen resultados similares en la aplicación de esta tecnología en células de ratón y en células humanas. Las particularidades de cada tipo celular y del desarrollo de cada especie deben ser tomadas en cuenta para futuros estudios y su aplicación técnica. Hasta ahora, las pruebas de células desdiferenciadas humanas se han hecho en ratones. El

que no se tome en cuenta la relación filogenética de estos dos grupos hace que los resultados estén lejos de ser concluyentes. Pero, las pruebas de células desdiferenciadas en humanos, *in vivo*, no será aprobado hasta que los científicos demuestren un 100% de la efectividad de esta tecnología. Con esto surge la pregunta de ¿en quiénes hacer las pruebas? Las aplicaciones de esta tecnología son evidentes, tanto en el campo del conocimiento científico, en el tecnológico y en el clínico-médico. Este último punto trae el tema ético a la mesa de discusión. A pesar de que se trata de una línea de investigación reciente que ha crecido a pasos agigantados, pareciera que el camino que recorrerás es tortuoso y que, al menos, no se ve una aplicación segura en un futuro cercano.

Esta investigación, genera preguntas que involucran a todos los aspectos de la biología. La teoría evolutiva del desarrollo da entonces evidencias de que el proceso evolutivo es un hecho. El que permita constatar que cuatro genes del desarrollo son prueba de evolución dentro del grupo de los animales, en las especies e incluso en líneas celulares, le da tanta fuerza explicativa como la que tiene la paleontología, por ejemplo, en relación a lo evolutivo.

Referencias

- Araki, R. *et al.* 2013. "Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells". *Nature*. 00 (000): 1-5.
- Arnosti, D. y Kulkarni, M. 2005. "Transcriptional enhancers: intelligent enhanceosomes or flexible billboards?" *Journal of Cellular Biochemistry*. 94:890-898.
- Arthur, W. 2002. "The emerging conceptual framework of evolutionary developmental biology." *Nature*. 415, 757-764.
- Babu, M. *et al.* 2004. "Structure and evolution of transcriptional regulatory networks". *Current Opinion in Structural Biology*. 14: 283-291.
- Badis, G. *et al.* 2009. "Diversity and Complexity in DNA Recognition by Transcription Factors" *Science*. 324 (5935): 1720-1723.
- Borok, M. *et al.*, 2010. "Dissecting the regulatory switches of development: lessons from enhancer evolution in *Drosophila*". *Development*. 137-1: 5-13.
- Boyer, L., *et al.* 2005. "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells". *Cell*. 122: 947-956.
- Breiling, A. *et al.* 2001. "General transcription factors bind promoters repressed by Polycomb group proteins". *Nature*. 412: 651-655.
- Campbell, N. 2005. *Biología*. Editorial Médica Panamericana. España.
- Cañón, S. *et al.* 2006. "Germ Cell Restricted Expression of Chick *Nanog*". *Developmental dynamics*. 235: 2889-2894.
- Carroll, S. 2008. "Evo-Devo and an Expanding Evolutionary Synthesis: a genetic theory of morphological Evolution". *Cell*. 134: 25-36.
- Chen, K. y Rajewsky, N. 2007. "The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs". *Nature Reviews Genetics*. 8: 93- 103.
- Davis, R. L., Weintraub, H., and Lassar, A. B. 1987. "Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts". *Cell*. 51: 987-1000.
- De Robertis, E.M. 2008. "Evo-devo: Variations on Ancestral Themes". *Cell*. 132: 185-195.
- Evans, M. J. y Kaufman, M. H. 1981. "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos". *Nature*. 292: 154-156.
- Feinberg, A.P. *et al.* 2006. "The epigenetic progenitor origin of human cancer". *Nature Review Genetics*. 7 (1): 21-33
- Foshay, K. *et al.* 2012. "Embryonic Stem Cells Induce Pluripotency in Somatic Cell Fusion

- through Biphasic Reprogramming”. *Cell*. 46: 159-170.
- Fuellen, G. y Struckmann, S. 2010. “Evolution of gene regulation of pluripotency –the case for wiki tracks at genome browsers”. *Biology direct*. 5:67
- García, T. 2005. “Evolución, desarrollo y (auto) organización. Un estudio sobre los principios filosóficos de la evo-devo”. Tesis de doctorado. Universidad del País Vasco.
- Gilad, Y. *et al.* 2006. “Expression profiling in primates reveals a rapid evolution of human transcription factors”. *Nature*. 440: 242-245.
- Gilbert, S. 2003. “The morphogenesis of evolutionary developmental biology”. *The International Journal of Developmental Biology*. 47: 467- 477.
- Gilbert, S. 2006. *Developmental biology*. Sinauer associates, Inc. 816 pp.
- Goodman, C. y Coughlin, B. 2000. “The evolution of evo-devo biology”. *PNAS* 97: 4424 – 4425.
- Gulick, J. y Robbins, J. 2009. “Cell-type-specific transgenesis in the mouse”. *Methods in molecular biology*. 561: 91-104.
- Gurdon, J. B. 1962. “The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles”. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*. 10: 622-640.
- Gurdon, J. y Melton, D. 2008. “Nuclear Reprogramming in Cells”. *Science*. 322: 1811-1815.
- Guruharsha, K. y Vijayraghavan, K. 2004. “Discrimination in partnership: compartment-specific interactions of Hox proteins” *Journal of genetics*. Vol 83, No 3.
- Grskovic, M. y Ramalho-Santos, M. 2008 “The pluripotent transcriptome” *StemBook*. The Stem Cell Research Community. StemBook, doi/10.3824/stembook.1.24.1, <http://www.stembook.org>.
- Hall, B. 2003. “Evo-devo: evolutionary developmental mechanisms”. *The International Journal of Developmental Biology*. 47: 491-495.
- Hanna, J. *et al.* 2007. “Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin”. *Science*. 318:1920-1923.
- Hartl, D. y Jones, E. 2005. *Genetics. Analysis of genes and genomes*. Jones and Bartlett Publishers. 815 p.

- Hartl, D. y Jones, E. 2009. *Genetics. Analysis of genes and genomes*. Jones and Bartlett Publishers. 763 p.
- Hobert, O. 2008. "Gene Regulation by Transcription Factors and MicroRNAs" *Science* . 319: 1785-1786.
- Hoekstra, H. y Coyne, J. 2007. "The locus of evolution: Evo devo and the genetics of adaptation". *Evolution*. 61-5: 99-1016.
- Human Genome Sequencing Consortium, International. 2004. *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature, Vol. 431. Issue 7011. p 931- 945.
- Hueber, S. *et al.* 2007. "Comparative analysis of Hox downstream genes in *Drosophila*" *Development*. 134: 381-392.
- Hueber, S. y Lohmann, I. 2008. "Shaping segments: hox gene function in the genome age". *BioEssays*. 30: 965-979.
- Kadonaga, J. 1998. "Eukaryotic Transcription: An Interlaced Network of Transcription Factors and Chromatin – Modifying Machines". *Cell*. 92: 307-313.
- Karp, G. 1981. *Development*. Mc Graw-Hill. Inc. pp. 692 .
- Kamachi, Y. *et al.* 2009. "Evolution of non-coding regulatory sequences involved in the developmental process: Reflection of differential employment of paralogous genes as highlighted by Sox2 and group B1 Sox genes" *Proceedings of the Japan Academy*. 2 (85): 55-68.
- Kinoshita, K. *et al.* "GABP α regulates Oct $\frac{3}{4}$ expression in mouse embryonic stem cells" *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 353: 686-691.
- Lappin, T. *et al.* 2006. "Hox genes: seductive science, mysterious mechanisms." *Ulster Med. J.* 75, 23-31.
- Leone, G. *et al.* 1997 "Myc and Ras collaborate in inducing accumulation of active cyclin E/Cdk2 and E2F" *Nature*. 387: 422-426.
- Loh, Y. *et al.* 2009. "Generation of induced pluripotent stem cells from human blood". *Blood Journal*. 22 (113): 5476- 5479.
- Maherali, N. *et al.* 2007. "Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution" *Cell Stem Cell*. 1: 55-70.
- Martin, G. R. 1981. "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured

- in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 78: 7634-7638.
- Migliani, H. S. 2002. *Advanced genetics*. Alpha science.
- Navarro, P., *et al.* 2012. "OCT4-SOX2 independent Nanog autorepression modulates heterogeneous Nanog gene expression in mouse ES cells". *The EMBO Journal*. 1-16.
- Osafune, K. *et al.* 2007. "Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines". *Nature biotechnology*. 26: 313-315.
- Pan, G. *et al.* 2007. "Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells." *Cell Stem Cell* 1: 299-312.
- Pain, D. *et al.* 2005. "Multiple Retropseudogenes from Pluripotent Cell-specific Gene Expression Indicates a Potential Signature for Novel Gene Identification". *The Journal of Biological Chemistry*. 8 (280): 6265-6268.
- Pavlopoulos, A. y Akam, M. 2007. "Hox go omics: insights from Drosophila into Hox genes targets." *Genome Biology* 8: 208.
- Pearson, H. 2006. "Genetics: what is a gene?" *Nature*. 25-44: 398-401.
- Pepper, J. *et al.* 2009 "Cancer research meets evolutionary biology" *Evolutionary Applications*. 2: 62-70
- Peter, I. y Davidson, E. 2011. "Evolution of gene regulatory networks controlling body plan development". *Cell*. 144: 970-985.
- Pick, L. y Heffer, A. 2012. "Hox gene evolution: multiple mechanisms contributing to evolutionary novelties." *Annals of the New York Academy of Science*. 1256: 15-32.
- Quinn, M. y Findlay, J. 2012. "Attributes of Oct4 in stem cell biology: perspectives on cancer stem cells of the ovary." *Journal of ovarian research*. 5:37.
- Ridley, M. 2004. *Evolution*. Blackwell Publishing. pp. 786.
- Salazar-Ciudad, I. 2009. "Looking at the origin of phenotypic variation from pattern formation gene networks". *Indian Academy of Sciences*. 34 (4): 573-587.
- Schneuwly, S., Klemenz, R., and Gehring W. J. 1987. "Redesigning the body plan of Drosophila by ectopic expression of the homeotic gene Antennapedia". *Nature*. 325: 816-818.
- Schneuwly, S. *et al.* 1987. "Molecular analysis of the dominant homeotic Antennapedia

- phenotype". *The EMBO Journal*. 1 (6): 201-206.
- Smith, A. G., *et al.* 1988. "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides". *Nature*. 336: 688-690.
- Spitz, F. y Furlong, E. 2012. "Transcription factors: from enhancer binding to developmental control". *Nature Reviews. Genetics*. 13: 613- 626.
- Stern, D. 2000. "Perspective: evolutionary developmental biology and the problem of variation" *International Journal of Organic Evolution*. 54-4: 1079-1091.
- Sullivan, G. *et al.* 2010. "Generation of Functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent Stem Cells". *Hepatology*, 51: 329-335.
- Tada, M., *et al.* 2001. "Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells". *Current Biology*. 11: 1553- 1558.
- Takahashi, K. y Yamanaka, S. 2006. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors". *Cell*. 126: 663-676.
- Takahashi, K., *et al.* 2007. "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors". *Cell*. 131: 1-12.
- Tesar, P. *et al.* 2007. "New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells". *Nature*. 448:196-199.
- The Internacional Stem Cell Initiative. 2007. "Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative" *Nature Biotechnology*. 25: 803-816.
- Thomson, J. A., *et al.* 1998. "Embryonic stem cell lines derived from human blastocyst". *Science*. 282: 1145-1147.
- Tsai, C. *et al.* 2012. "Oct4 and Nanog Directly Regulate Dnmt1 to Maintain Self-Renewal and Undifferentiated State in Mesenchymal Stem Cells" *Cell*. 47: 169-182.
- Turner, B. 2009. "Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications". *Philosophical transactions of The Royal Society*. 364: 3403-3418
- Vaquerizas, J. *et al.* 2009. "A census of human transcription factors: function, expression and evolution". *Nature*. 10: 252-263.
- Vierbuchen, T. *et al.* 2010. "Direct conversión of fibroblasts to functional neurons by defined factors". *Nature*. 463: 1035-1041.
- Wang, J. *et al.* 2006. "A protein interaction network for pluripotency of embryonic stem

- cells". *Nature*. 444:364-368.
- Watanabe, A. *et al.* 2012. "Epigenetic regulation in pluripotent stem cells: a key to breaking the epigenetic barrier." *The Royal Society*. 268: 1-11.
- Watanabe, A. *et al.* 2013. "Epigenetic regulation in pluripotent stem cells: a key to breaking the epigenetic barrier". *Philosophical transactions of The Royal Society*. 368 (1609).
- Wernig, M. *et al.* 2007. "In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state". *Nature*. 448: 318-324.
- Wilmut, I., *et al.* 1997. "Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells". *Nature*. 385: 810-813.
- Wittkopp, P. y Kalay, G. 2011. "Cis- regulatory elements: molecular mechanisms and evolutionary processes underlying divergence" *Nature*. 13:59-69.
- Wolf, J. *et al.*, 2001. "Developmental interactions and the constituents of quantitative variation" *Evolution*. 55 (2) 232-245.
- Wolpert, L. 2002. *Principles of Development*. Oxford University Press. NY. 542 pp.
- Yamanaka, S. 2012. "Induced pluripotent stem cells: past, present, and future." *Cell Stem Cell* 10: 678- 684.
- Yamanaka, S. y Okita, K. 2011. "Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges." *The Royal Society* 366: 2198-2207.
- Yuan, H. *et al.* 1995. "Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3" *Genes and development*. 9:2635-2645.
- Zhao, T. *et al.* 2011. "Immunogenicity of induced pluripotent stem cells". *Nature*. 474: 212- 216.
- Zhong, W. *et al.* 2006. "Hypertrophic growth in cardiac myocytes is mediated by Myc through a Cyclin D2-dependent pathway" *The European Molecular Biology Organization*. 25: 3869-3879.
- Zhong, Y. y Holland, P. 2011. "The dynamics of vertebrate homeobox gene evolution: gain and loss of genes in mouse and human lineage." *BMC Evolutionary Biology*, 11: 169.
- Zhou, H. *et al.* 2009. "Generation of Induced Pluripotent Stem Cells using Recombinant Proteins". *Cell Stem Cell*. 4:381-384.
- Zhou, Q. *et al.* 2008. "In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-

cells". *Nature*. 445: 627-632.

Zurita, M. 2002. *Los genes homeóticos y el desarrollo de la mosca*. En *CIENCIAS*. No. 65 enero-febrero.

Páginas de internet

Definición de gen Oct ³/₄

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?db=gene&cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=5460

(Revisado 4 de marzo de 2013)

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=POU5F1&search=oct+4>

(Revisado 5 marzo de 2013)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/18999>

(revisado 10 de marzo de 2013)

Definición de gen Sox2

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=SOX2>

(Revisado 4 de marzo de 2013)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6657>

(Revisado 10 de marzo de 2013)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/20674>

(revisado 10 de marzo de 2013)

<http://www.wikigenes.org/e/gene/e/6657.html>

(Revisado 11 de marzo de 2013)

Definición de gen Myc

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/17869>

(revisado 10 marzo de 2013)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/24577>

(Revisado 10 de marzo de 2013)

Definición de gen Klf4

<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=KLF4&search=klf4>

(revisado el 5 de marzo de 2013)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9314>

(revisado 10 de marzo de 2013)

Definición Polimorfismo

<http://oxforddictionaries.com/definition/english/polymorphism?q=polymorphism>

(revisado 11 de mayo de 2013)

Definición de teratocarcinoma

<http://www.merriam-webster.com/medlineplus/teratocarcinoma>

(revisado 11 de mayo de 2013)

Trayectoria de Shinya Yamanaka

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/yamanaka.html

http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/press.html#

(Revisado 15 de mayo de 2013)