

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



1 Número de publicación: **2 539 125** 

51 Int. CI.:	
C12N 5/16	(2006.01)
C12N 5/074	(2010.01)

(12)	TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA		Т3	
<ul> <li>Fecha de presentación y núme</li> <li>Fecha y número de publicación</li> </ul>	ero de la solicitud europea: n de la concesión europea:	10.02.2009 15.04.2015	E 09710897 (1) EP 2271746	

## 54 Título: Método para reprogramar células diferenciadas

30 Prioridad:	Titular/es:
<ul> <li>13.02.2008 EP 08101576</li> <li>(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 26.06.2015</li> </ul>	COSMA, MARIA PIA (50.0%) Via Armando Diaz, 28 Salerno, IT y VIÑAS, FREDERIC LLUIS (50.0%) (72) Inventor/es: COSMA, MARIA PIA y VIÑAS, FREDERIC LLUIS
	(74) Agente/Representante: VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

### DESCRIPCIÓN

Método para reprogramar células diferenciadas

#### 5 Campo de la invención

15

La presente invención se refiere a un método para reprogramar una célula diferenciada a una célula indiferenciada por medio de un activador Wnt/β-catenina o un inhibidor GSK-3.

#### 10 Antecedentes de la invención

La ruta de señalización Wnt/β-catenina regula varios procesos celulares durante el desarrollo de vertebrados e invertebrados, incluyendo la proliferación y diferenciación celular, muerte celular, y organogénesis (Karner et al., 2006; Reya y Clevers, 2005). Además la ruta Wnt/β-catenina controla la homeostasis tisular y la regeneración en respuesta a un daño en el pez cebra, Xenopus, planarios, e incluso en mamíferos adultos (Gurley et al., 2008; Ito et

al., 2007; Osakada et al., 2007; Petersen y Reddien, 2008; Stoick-Cooper et al., 2007; Yokoyama et al., 2007).

La β-catenina une las cadherinas al citoesqueleto en la adhesión célula-célula y actúa como una molécula de señalización intracelular en la ruta Wnt. La unión de los ligandos Wnt a los receptores Frizzled y LRP5/6 da como resultado la inactivación de un complejo de destrucción multiproteico, que está compuesto por glucógeno sintasa 20 quinasa-3 (GSK-3), Axin y proteína de la poliposis adenomatosa cólica (APC). Esta inactivación da lugar a una disminución de la fosforilación de la  $\beta$ -catenina, lo que permite entonces que la  $\beta$ -catenina escape a la degradación mediada por la ubiquitina - proteosoma (Willert y Jones, 2006). Como consecuencia, la β-catenina se acumula en el citoplasma y se traslada al núcleo, dando lugar a la activación transcripcional de una plétora de genes diana que

- controlan varios procesos celulares y tisulares (Hoppler y Kavanagh, 2007). En ausencia de activación Wnt, la β-25 catenina se fosforila por el complejo de destrucción y se degrada por el sistema de ubiguitina - proteosoma. La activación de la señalización Wnt/B-catenina induce la expresión de múltiples antagonistas que actúan de manera coordinada para cerrar la ruta simultáneamente en muchos niveles. Extracelularmente, las proteínas Wif-1 y Dkk inhiben la señalización Wnt interactuando con la proteína Wnt y los receptores LRP5/6, respectivamente (Kawano y
- Kypta, 2003). Intracelularmente, tanto la Nkd-1 como la Axin 2 potencian la degradación de β-catenina por medio del 30 aumento de la formación del complejo de destrucción (Behrens, 2005; Wharton et al., 2001). Las proteínas Wnt forman una gran familia de isoformas (desde la Wnt1 a Wnt10b, Wnt11 y Wnt16) (Kikuchi et al., 2007). Entre estas, la Wnt3a ha demostrado que potencia la auto-renovación y mantiene la totipotencia de las células madre embrionarias (ES) y las células madre hematopoyéticas (HSC) (Anton et al., 2007; Reya et al., 2003) por medio de la
- 35 acumulación de  $\beta$ -catenina en el núcleo celular. Así mismo, tanto la activación de los homólogos GSK-3 $\alpha$  y GSK-3 $\beta$ como las mutaciones en APC dan lugar a la estabilización de la β-catenina y compromete seriamente la capacidad de las células ES para diferenciarse y para mantener su rigor (Doble et al., 2007; Kielman et al., 2002; Sato et al., 2004).
- La reprogramación puede permitir la indiferenciación de las células diferenciadas hacia la pluripotencia y puede 40 tener lugar por medio de diferentes mecanismos. La transferencia nuclear somática ha permitido la clonación de diferentes animales por medio de la reprogramación de un núcleo diferenciado (Vaita, 2007). Recientes hallazgos ha demostrado que la sobre-expresión de cuatro factores de transcripción específicos de células ES que codifican genes de células somáticas de ratón y ser humano pueden inducirlas a convertirse en pluripotentes (Aoi et al., 2008;
- Brambrink et al., 2008; Hanna et al., 2008; Kim et al., 2008; Lowry et al., 2008; Maherali et al., 2007; Park et al., 45 2008; Takahashi et al., 2007; Takahashi y Yamanaka, 2006; Yu et al., 2007). Las células somáticas de ratón y ser humano también se pueden reprogramar por fusión con células ES, y Nanog, un factor que mantiene las células ES en su estado indiferenciado, aumenta la pluripotencia de los híbridos (Cowan et al., 2005; Silva et al., 2006; Tada et al., 1997; Tada et al., 2001). También se han visto en los híbridos célula ES-timocitos, la reactivación del cromosoma
- 50 X inactivo, la corrección de la metilación de ADN asociada con genes impresos, y la reactivación del transgén Oct4-GFP. Además, cuando estas células híbridas se introducen en blastocistos diploides huésped, contribuyen a las tres capas germinales de los embriones quiméricos (Tada et al., 1997; Tada et al., 2001). Se han comunicado hallazgos similares tras la fusión de fibroblastos humanos con células ES humanas. Los híbridos tetraploides que se obtenían mostraban el fenotipo y tasa de crecimiento de las células ES humanas. El genoma somático se reprogramó, como 55
- se demuestra por el análisis transcripcional de genoma completo tipo célula ES humana (Cowan et al., 2005).

La Solicitud de Patente WO 2007/115216 proporciona métodos para reprogramar terapéuticamente células madre adultas de seres humanos en células pluripotentes. Tales métodos consisten en el aislamiento de una célula madre adulta de ser humano y ponerla en contacto con un medio que comprende factores estimulantes que inducen el desarrollo de la célula madre en una célula reprogramada terapéuticamente. El medio comprende PM-10™. Tal

- 60 método ha sido propuesto también en la Solicitud de Patente WO 2005/123123 en la que el factor estimulante es un producto químico seleccionado de entre el grupo que consiste en 5-aza-2'-desoxicitidina, inhibidor de la histona desacetilasa, ácido n-butírico y tricostatina.
- 65 La Solicitud de Patente WO 2007/054720 desvela métodos para reprogramar y modificar genéticamente células. En

esta solicitud se obtiene un genoma pluripotente a partir de un genoma diferenciado fusionando una célula pluripotente con una célula diferenciada en presencia de Nanog o un inhibidor MEK.

La Solicitud de Patente WO 2007/019398 proporciona métodos mejorados para reprogramar una célula animal somática diferenciada en una célula madre indiferenciada. Tales métodos comprenden (a) inyectar una o más células animales somáticas diferenciadas en un oocito, (i) remodelar la envoltura nuclear del núcleo de la células somática y (ii) reprogramar la cromatina de la célula somática y (b) transferir o fusionar el núcleo remodelado resultante que se obtiene en (a) en el citoplasma enucleado de una célula embrionaria indiferenciada para formar una célula madre indiferenciada.

10

35

La Solicitud de Patente WO 2007/016245 se refiere a métodos de reprogramación de células madre adultas o células madre que se obtienen de la sangre del cordón umbilical o placentario o del tejido del cordón umbilical o la placenta o del líquido amniótico o del amnios. Las células madre reprogramadas se obtienen exponiendo células madre pluripotentes adultas o células progenitoras o células madre pluripotentes o células progenitoras de

- 15 tejido del cordón umbilical o la placenta o de la sangre del cordón umbilical o la placenta o del líquido amniótico o del amnios a una cantidad eficaz de medio de células madre embrionarias o a un procedimiento de enucleación para retirar el ADN nuclear de la células madre seguido por la introducción de material nuclear de un paciente que se va a tratar. El medio de células madre embrionarias es un medio mínimo esencial que comprende al menos un factor de crecimiento, glucosa, aminoácidos no esenciales, insulina y transferrina. El factor de crecimiento es el factor de
- 20 crecimiento de fibroblastos, el factor de transformación del crecimiento beta o mezclas de los mismos y dicho medio comprende además al menos un componente adicional que se selecciona de entre el grupo que consiste en ácido aminobutírico, ácido pipecólico, litio y mezclas de los mismos.

La Solicitud de Patente WO 2005/033297 desvela composiciones, métodos y kits para la reprogramación de transferencia no nuclear de una célula adulta diferenciada que se obtiene de un tejido de un adulto en una célula tipo ES. El método de producción de una célula tipo célula madre embrionaria reprogramada comprende poner en contacto una célula adulta diferenciada con una bacteria *Mycobacterium leprae*, o componentes de la misma que se seleccionan de entre el grupo que consiste en PGL-1, una fracción de pared celular completa, una proteína de la pared celular, un lípido de la pared celular, un carbohidrato de la pared celular, una proteína liberada por una 30 bacteria viable, y una proteína segregada por una bacteria viable.

La Solicitud de Patente WO 2005/068615 proporciona un método de cultivo de una célula madre pluripotente a la vez que se inhibe la diferenciación de la célula madre pluripotente por supresión de la señalización de Wnt/β-catenina. El supresor de la señalización de Wnt/β-catenina es sFRP, colágeno XVIII, endostatina, carboxipeptidasa Z, receptor de la tirosina quinasa, enzima transmembrana Corin, WIF-1, Cerebus, Dickkopf-1, o una combinación de los mismos.

La Solicitud de Patente WO 2007/016485 desvela el uso del inhibidor GSK-3 para mantener la potencia de las células cultivadas. Este documento se refiere al cultivo de células no embrionarias, que se pueden diferenciar en 40 tipos celulares de más de un linaje embrionario, en cultivo bajo condiciones que mantienen la capacidad de diferenciación durante la expansión; más particularmente, el cultivo de células no embrionarias en presencia de al menos un inhibidor GSK-3, tales como BIO. Por lo tanto, se han propuesto varias estrategias para reprogramar células diferenciadas tales como el trasplante nuclear de células somáticas, el tratamiento con extractos de células pluripotentes o la expresión estable de factores definidos. Sin embargo, tales estrategias presentan varios 45 inconvenientes que incluyen su aplicación limitada debido a la disponibilidad de los oocitos y la baja eficacia de la clonación, recuperando la célula reprogramada solamente algunas de las propiedades de las células pluripotentes o provocando efectos secundarios. Además, la reprogramación por medio del tratamiento con extractos de células pluripotentes da lugar a una reprogramación muy transitoria, si existe, de las células diferenciadas. Además, la reprogramación por medio de la expresión estable de factores definidos implica el uso de factores específicos de ES 50 (Oct4, klf4, sox2, lin28) o un oncogén (myc) que pueden dar lugar a efectos secundarios no deseados.

Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar un método de reprogramación de una célula somática que presente una alta eficacia de reprogramación y que sea más fisiológica.

#### 55 Descripción de la invención

La presente invención se refiere a un método para reprogramar una célula diferenciada en una célula madre indiferenciada por medio del uso de un activador Wnt/β-catenina o un inhibidor GSK-3.

- 60 Como la señalización Wnt/β-catenina controla la auto-renovación de ES y el mantenimiento del rigor (Sato et al., 2004), y regula la expresión de genes de células ES (Cole et al., 2008), los autores hicieron la hipótesis de que la ruta de señalización Wnt/β-catenina puede controlar también la reprogramación de células somáticas a pluripotencia.
- De hecho, los autores demuestran que la activación transitoria de la señalización de Wnt/β-catenina puede desencadenar la reprogramación de tres tipos diferentes de células somáticas. Se puede generar una gran cantidad

de colonias reprogramadas tras la fusión de células ES con células NS, fibroblastos o timocitos embrionarios de ratón, cultivando los híbridos transitoriamente con Wnt3a o un inhibidor de la glucógeno sintasa quinasa-3 (GSK-3) tales como 6-bromoindirubin-3'-oxima (BIO) y CHIR99021. Los clones aislados reprogramados expresan genes específicos de células ES, pierden los marcadores de diferenciación somática, se vuelven no metilados en las islas

- 5 CpG de Oct4 y Nanog, y se pueden diferenciar en cardiomiocitos in vitro y generar teratomas in vivo. Los clones aislados reprogramados son pluripotentes, ya que son capaces de diferenciarse in vitro e in vivo. Entonces los autores identifican la Wnt/β-catenina como la primera ruta que no es constitutivamente activa en las células ES, que puede iniciar la reprogramación celular. Esta ruta representa un interruptor para iniciar la cascada de eventos que da lugar a la reprogramación de células somáticas en organismos vivos.
- 10

30

35

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es un método para reprogramar una célula diferenciada en una célula madre indiferenciada que comprende la etapa de fusionar dicha célula diferenciada con una célula pluripotente aislada, en que dicha célula pluripotente asilada se trata in vitro con una cantidad adecuada de un activador de la ruta Wnt/β-catenina que es al menos una isoforma de la proteína Wnt o un inhibidor de la glucógeno sintasa guinasa-3.

15

Preferentemente, la célula pluripotente aislada se trata in vitro antes de la etapa de fusionar dicha célula diferenciada con dicha células pluripotente.

- Preferentemente la célula pluripotente aislada es una célula madre adulta. Tal célula se puede obtener por diferentes 20 métodos que se conocen en la técnica, también sin implicar la destrucción de embriones humanos. Más preferentemente la célula pluripotente aislada es una célula madre embrionaria. Tal célula se puede obtener por diferentes métodos que se conocen en la técnica, también sin implicar la destrucción de embriones humanos.
- 25 En una realización particular la célula diferenciada es una célula somática. Preferentemente la célula diferenciada es una célula madre neural. De manera alternativa la célula diferenciada es un fibroblasto embrionario. Alternativamente la célula diferenciada es un timocito.

Más preferentemente la célula pluripotente aislada es una célula de ratón o humana y la célula diferenciada es una célula de ratón o humana.

En una realización, el activador de la ruta Wnt/β-catenina es la menos una isoforma de la proteína Wnt. Preferentemente, las isoformas de la proteína Wnt se seleccionan de entre el grupo de: Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11 or Wnt16. Ejemplos de isoformas de proteína Wnt son las siguientes u ortólogos de los mismos (referencias Swiss-prot):

Homo sapiens: Wnt1: P04628; Wnt2: P09544; wnt2b/13: Q93097; wnt3: P56703; wnt3a: P56704; wnt4: P56705; wnt5a: P41221; wnt5b: Q9H1J7; wnt6: Q9Y6F9; wnt8a: Q9H1J5; wnt9a: 014904; wnt9b: 014905; wnt10a: Q9GZT5: wnt10b: 000744: wnt11: 096014: wnt16: Q9UBV4.

- Mus musculus: Wnt1: P04426; wnt2: P21552.1; wnt2b/13: 070283.2; wnt3: P17553; wnt3a: P27467; wnt4: 40 P22724; wnt5a: P22725; wnt5b: P22726; wnt6: P22727.1; wnt8a: Q64527; wnt9a: Q8R5M2; wnt9b: 035468.2; wnt10a: P70701; wnt10b: P48614; wnt11: P48615; wnt16: Q9QYS1.1.
- En una realización alternativa el activador de la ruta Wnt/β-catenina es un inhibidor de la glucógeno sintasa quinasa-45 3 (GSK-3). Preferentemente, el inhibidor de GSK-3 es BIO o CHIR99021 o un análogo de los mismos (Mus musculus: Q9WV60; Homo sapiens: P49841).

En una realización preferida el método de la invención comprende además la etapa de sobre-expresión de la proteína Nanog en la célula pluripotente aislada, o en la célula fusionada. Ejemplos de proteína Nanog son los 50 siguientes u ortólogos de los mismos: Mus musculus: Q80Z64; Homo sapiens: Q9H9S0.

Preferentemente, se obtiene la sobre-expresión de la proteína Nanog modificando genéticamente la célula pluripotente aislada o la célula fusionada con un vector adecuado que exprese la proteína Nanog.

- En la presente invención una célula diferenciada significa una célula especializada para una función específica (tal 55 como una célula de corazón, hígado o músculo) que no puede generar otros tipos de células. Una célula madre indiferenciada es una célula no especializada para una función específica que mantiene el potencial para dar lugar a células especializadas. Una célula pluripotente es una célula primordial que se puede diferenciar en un sub-grupo de tipos de células especializadas. Una célula madre adulta es una célula indiferenciada (llamada también célula madre
- somática) que está presente en tejidos de adultos, fetales o de recién nacidos y es capaz de diferenciarse en células 60 especializadas del tejido de las que se origina. Una célula madre embrionaria es una célula indiferenciada que está presente en embriones y es capaz de diferenciarse en cualquier tipo de célula especializada. Tal célula madre embrionaria, aunque está presente en embriones, también se puede obtener sin la destrucción de embriones. Una célula precursora es una célula que se encuentra un estado precoz de diferenciación y ya promete diferenciarse en
- 65 tipos celulares de un linaje específico. Una célula somática es cualquier célula de un organismo multicelular que no contribuirá a células de gametos.

La presente invención se desvelará en detalle en la siguiente descripción también por medio de ejemplos no limitantes en referencia a las siguientes figuras.

- Figura 1. La activación de la ruta Wnt por Wnt3a potencia la reprogramación mediada por fusión celular.
   (A) Placas representativas y cuantificación (como veces de aumentos del número de colonias) de colonias híbridas de las fusiones PEG de células ES-neo con células NS-Oct4-puro tratadas con Wnt3a, como se indica. Las colonias se tiñeron por la expresión de AP y se contaron (media ± e.e.m.; n = 3).
   (B) Imágenes de fluorescencia de algunas colonias híbridas reprogramadas después de 24 h del tratamiento con Wnt3a (10x de aumento).
   (C) Cuantificación de las colonias híbridas de las fusiones PEG de células ES-neo y células MEF-higro
- sin tratar y tratadas con Dkk1 y Wnt3a, como se indica (media ± e.e.m.; n = 3).
   Figura 2. Optimización de la concentración de Wnt3a y BIO para la reprogramación celular. Fusiones ESneo x NS-Oct4-puro tratadas durante 24 h con las concentraciones indicadas de Wnt3a o BIO. Tras la fusión y la selección con puromicina, las colonias se tiñeron por expresión de fosfatasa alcalina (PA) y se contaron. Se muestran las veces de aumentos en el número de colonias (media ± e.e.m.; n = 3).
- Figura 3. Visión esquemática del sistema experimental. Las células ES-neo que expresaban genes pluripotentes se fusionaron con células Ns-Oct4-puro que expresaban genes específicos neurales. Para ensayar el papel de la ruta Wnt/β-catenina en la reprogramación por fusión celular, se trataron las células de dos maneras: (1) Se trataron las células ES-neo con BIO durante tiempos diferentes antes de fusionarse con células
- NS-Oct4-puro sin tratar; o (2) las células se fusionaron primero, y luego se trataron con Wnt3a o BIO durante tiempos diferentes. Solo después de la reprogramación completa del epigenoma celular NS-Oct4-puro se tendrán colonias de híbridos primarios viables de células pluripotentes con una forma fenotípica de células ES, debido a: i) el promotor Oct4 estará activo en el genoma de células NS y expresará el gen de resistencia a la puromicina y GFP; y ii) las células híbridas proliferarán en medio celular ES (que contiene suero fetal bovino y LIF, dos señales que promueven la diferenciación de las células NS).
- Figura 4. El tratamiento con BIO de células ES y células ES x NS no aumenta la clonogenicidad y viabilidad celulares. Las células ES-neo (A) y los híbridos reprogramados ES x NS (B) (tratados o no durante 24 h con BIO) se colocaron en placas a distintas densidades. Tras 10 días, las placas se tiñeron con AP y se contaron. Las veces de cambios en las colonias se muestran en los gráficos (media ± e.e.m.; n = 3).
- Figura 5. La activación de la ruta Wnt/β-catenina con BIO aumenta el número de colonias híbridas reprogramadas en fusiones de tres tipos celulares. (A) Cuantificación (como veces de aumento en el número de colonias) de colonias híbridas de fusiones PEG de células ES-neo con células NS-Oct4-puro tratadas con BIO, como se indica. (A, C) Placas representativas y (A, C, E) veces de aumento en el número de colonias de colonias de fusiones indicadas tratadas con BIO, como se indica. teñidas por la expresión de PA y contadas. Los aumentos de las veces de cambios en las colonias reprogramadas se muestra también en los
- contadas. Los aumentos de las veces de cambios en las colonias reprogramadas se muestra tambien en los gráficos (media ± e.e.m.; n = 3). (B, D, F) Imágenes de microscopía óptica de algunas colonias híbridas reprogramadas después de 24 h del tratamiento con BIO (10x de aumento).
   Figura 6. Tratamiento con BIO de células ES no potencia la fusión mediada por PEG. Las placas que
- 40 higro no tratadas. Los clones se tiñeron por la expresión de AP y se contaron. Las veces de cambios de las colonias se muestran en los gráficos (media ± e.e.m.; n = 3). (B) Cuantificación (como veces de aumento del número de colonias) de colonias híbridas de fusiones PEG de células ES-neo con células NS-Oct4-puro. A los híbridos de dos experimentos de fusión (2.000.000 células/matraz) se les permitió recuperarse durante 3 h después de la fusión PEG. Se agruparon y se dividieron en 5 placas (650.000 células/placa) de tal manera que las células no se tocaban unas con otras. Dos horas después de colonias reprogramadas se muestran en los

gráficos (media  $\pm$  e.e.m.; n = 3).

Figura 7. Activación de la ruta de señalización de Wnt/β-catenina cíclica por medio de Wnt3a que capacita a las células ES para reprograma células NS sin activación de genes de célula madre. (A) Las placas

- 50 representativas y la cuantificación (como veces de aumento en el número de colonias) de las colonias híbridas de fusiones PEG entre las células ES-Neo pre-tratadas y las células NS-Oct4-puro no tratadas, como se indica. Las colonias se tiñeron por expresión de AP y se contaron (media  $\pm$  e.e.m.; n = 3). **(B)** Trasferencia de Western de los extractos de proteína de células ES de los pre-tratamientos con Wnt3a de (A), como se indica. **(C)** Inmunofluorescencia para la visualización de la localización de la β-catenina en las células ES de los pre-
- 55 tratamientos con Wnť3a de (A), como se indica. (D) Análisis RT-PCR cuantitativo de los genes específicos de células ES (*Nanog, Oct4, Rex1* y *Fgf4*) y dianas de la β-catenina (*Axin2, Cdx1* y *c-Myc*) en el ARNm total purificado de las células ES con pre-tratamientos con Wnt3a de (A), como se indica. (E) Análisis RT-PCR cuantitativo de los niveles de transcripción de *Axin2* y *Nanog* en células ES con los pre-tratamientos con Wnt3a de (A), como se indica (media ± e.e.m.; n = 3)
- 60 **Figura 8. Análisis FACS de los productos de fusión primarios.** Fusiones PEG de células ES-GFP con células NS-Oct4-puro. Se permitió que las células de los experimentos de fusión se recuperaran durante 3 h tras la fusión PEG. Las células se fijaron y marcaron con Nestina (que se expresa solo en las células NS). El porcentaje de células coloreadas positivas dobles (GFP/PE) se indica en cada panel.
- Figura 9. Acumulación periódica de β-catenina en células ES por medio de inhibición BIO de los aumentos de la reprogramación por GSK-3 de las células NS sin activación de genes de células madre.

(A) Las placas representativas y la cuantificación de colonias híbridas de las fusiones PEG entre células ES-Neo pre-tratadas con BIO y células NS-Oct4-puro no tratadas, como se indica. Las colonias se tiñeron por expresión de AP y se contaron. La cuantificación muestra también las células NS-Oct4-puro pre-tratadas con BIO fusionadas con células ES-Neo no tratadas (barras grises) (media  $\pm$  e.e.m.; n = 3). (B) Imagen de microscopía

- 5 óptica de una colonia híbrida reprogramada asilada de fusiones con células ES-neo pre-tratadas con BIO durante 24 h (24 h) y células NS-Oct4-puro (aumento de 10x). (C) Transferencia de Western de los extractos de proteína de las células ES pre-tratadas con BIO de (A), como se indica. (D) Inmunofluorescencia para la visualización de la localización de β-catenina en las células ES de los pre-tratamiento con BIO de (A) como se indica. (E) Análisis RT-PCR semicuantitativo de los marcadores de ES (*Nanog, Oct4, Rex1* y *Fgf4*) y dianas de β-catenina (*Axin2,*
- 10 Cdx1 y c-Myc) en el ARNm total purificado de las células ES pre-tratadas con BIO de (A), como se indica. (F) Análisis RT-PCR cuantitativo de las transcripciones de Axin2 y Nanog en las células ES pre-tratadas con BIO (media ± e.e.m.; n = 3).

Figura 10. Las células ES tratadas con concentraciones crecientes de BIO muestran un aumento de la activación de Topflash, un aumento de la localización nuclear de la β-catenina y una disminución de los

15 niveles de fosfo-β-catenina. (A) Ensayo de indicador luciferasa de las células ES nucleofectadas con las construcciones indicadoras (Topflash o Fopflash) y tratadas durante 24 h con Wnt3a o diferentes concentraciones de BIO. Se utilizaron células GSK3 -/- como control ya que inducen una activación de Topflash muy alta. Cada barra representa la media de los tres experimentos independientes (media ± e.e.m.; n = 3). (B) Localización de β-catenina en las células ES tratadas durante 24 h con BIO a diferentes concentraciones, como se indica. (C) Transferencia de Western de los extractos de proteínas de las células ES tratadas durante 24 h

con BIO a diferentes concentraciones, como se indica.
 Figura 11. La sobre-expresión de Axin2 en células ES inhibe su capacidad de reprogramación. (A)
 Cuantificación (como número de colonias) de colonias híbridas de fusiones PEG de clones ES-Axin2 (F5, D5, B6, D7, A9) con células NS-Oct4-puro (media ± e.e.m.; n = 3). (B) Transferencia de Western de extractos de protectiona de las elementes ES avis a construction de colonias en extractos de las elementes ES avis a construction de colonias en extractos de las elementes ES avis a construction de colonias en extractos de las elementes ES avis a construction de colonias en extractos de las elementes ES avis a construction de colonias en extractos de las elementes ES avis a construction de colonias en extractos de las elementes ES avis a construction de colonias en extractos de las elementes ES avis a construction de colonias en extractos de las elementes ES avis a construction de colonias en extractos de las elementes ES avis a construction de colonias en extractos de las elementes ES avis a construction de colonias elementes elementes en extractos de las elementes ES avis a construction de colonias elementes eleme

- proteínas de los clones ES que sobre-expresan Axin2. (C) Ánálisis RT-PCR de la expresión de Axin2 en ES tratadas durante 24 h con BIO y clones ES-Axin2, como se indica.
   Figura 12. El tratamiento de células NS-Oct4-puro con BIO antes de la fusión con células ES-neo da como resultado un escaso aumento de la reprogramación. (A) Las placas que contenían colonias híbridas fusionadas entre células NS-Oct4-puro tratadas con BIO y células ES-neo no tratadas. Los clones se tiñeron por
- 30 expresión de AP y se contaron. Los aumentos en veces de cambios en las colonias reprogramadas se muestran en el gráfico (media ± e.e.m.; n = 3). (B) Ejemplo de una colonia aislada reprogramada de células ES-neo fusionadas con células NS-Oct4-puro pre-tratadas con BIO durante 24 h. (C) Transferencia de Western de los extractos de proteína total de las células NS-Oct4-puro a los tiempos de tratamiento indicados.
   Figura 13. Los bajos niveles de β-catenina estabilizada inducen la reprogramación de células NS. (A)
- 35 Ensayo indicador luciferasa de clones ES-β-catenina nucleofectados con la construcción indicadora Topflash. (B) Cuantificación (como veces de aumento del número de colonias) de las colonias híbridas de las fusiones PEG de los clones ES-β-catenina (E1, F19, A13, A12, C2) con células NS-Oct4-puro, y de la fusión PEG de ES tipo silvestre o células GSK3-/- con células NS-Oct4-puro, como se indica (media ± e.e.m.; n = 3). (C) Ensayo de indicador luciferasa (Topflash) de células ES sin tratar y tratadas durante 24 h con 1 μM de BIO o 100 ng de Wnt3a, y del clon E1 (media ± e.e.m.; n = 3).
- Figura 14. Los híbridos aislados son pluripotentes y se pueden diferenciar in vitro o in vivo. (A) Cariotipo normal y (B) expresión GFP en diferentes clones híbridos reprogramados aislados de fusiones de células ES-neo pre-tratadas con BIO (24 h) y células NS-Oct4-puro. (C) Análisis RT-PCR de Oct4, Nanog, Rex1, Blbp y Olig2 en células ES, células NS y algunos de los clones híbridos, como se indica. (D) Secuenciación genómica con
- 45 bisulfito de las regiones promotoras de Oct4 y Nanog en células ES, células NS y clones híbridos. Los círculos vacíos indican dinucleótidos CpG no metilados; los círculos rellenos indican CpG metilados. (E) Morfología de cuerpos embrioides durante la diferenciación, como se indica. (F) Análisis RT-PRC de marcadores de diferenciación en células ES, células NS y clones híbridos, como se indica. (G) Tinción por hematoxilina eosina del teratoma derivada de células de un clon reprogramado trasplantado subcutáneamente en ratones SCID.
- Figura 15. Análisis de los 21 clones híbridos diferentes aislados de la fusión de células NS-Oct4-puro con células ES-neo que se pre-trataron con BIO. Análisis RT-PCR de Oct4, Nanog, Rex1, Blbp y Olig2 en ES-neo, en NS-Oct4-puro y en los 21 clones híbridos.
   Figura 16. Los híbridos ES x MEF y ES x timocitos son pluripotentes y se pueden diferenciar *in vitro*. Los proverse presentes de ES neo y MEF hiere y Es hi
- grupos reprogramados aislados de las fusiones de ES-neo x MEF-higro y Es-higro x Timocitos-neo tratados durante 24 h con BIO. (A) Análisis RT-PCR de Oct4, Nanog, CD4, CD8, Col1a1, Col1a2 en células ES, MEF, timocitos y clones híbridos, como se indica. (B) Morfología de los cuerpos embrioides durante la diferenciación, como se indica. (C) Análisis RT-PCR de los marcadores de diferenciación en células ES y clones híbridos, como se indica.

Figura 17. Formación de teratomas de clones híbridos Es-neo x NS-Oct4-puro. Las células híbridas (1,5 x 10<sup>7</sup>) se inyectaron subcutáneamente en ratones inmunodeficientes (SCID). Cuatro semanas después de la inyección, se fotografiaron los teratomas antes de recolectarse y analizarse.
 Figura 18. Acumulación periódica de β-catenina en células ES que las capacita para reprogramar células somáticas tras la fusión. En el momento cero (células no tratadas), los niveles de β-catenina son bajas debido a su degradación por medio del complejo de destrucción. Tras 24 h de tratamiento con Wnt3a o BIO, se activa la

65 ruta Wnt/β-catenina, la β-catenina se estabiliza y entra en el núcleo. Una vez en el núcleo, activa varios genes

diana, incluyendo un hipotético desconocido "reprogramador", un factor maestro que puede dirigir la reprogramación en las células somáticas tras la fusión. La acumulación de β-catenina también activa la transcripción de sus inhibidores, Axin2 y Dkk4. En los dos puntos de tiempo siguientes, tras 48 h y 72 h de tratamiento con Wnt3a o BIO de las células ES, los altos niveles de Axin2 aumentan la formación del complejo de

- destrucción y entonces la β-catenina se fosforila y se degrada. Además, el Dkk4 inhibe la señalización de Wnt 5 interactuando con su receptor. Por lo tanto, las células ES no pueden reprogramar las células somáticas. Finalmente, las 96 h de tratamiento con Wnt3a o BIO de las células ES da lugar a la activación de la señalización Wnt/β-catenina, inactivación del complejo de destrucción multiproteico, la acumulación de β-catenina en el núcleo, la transcripción del "reprogramador", y la consecuente capacidad de las células ES para reprogramar
- 10 células somáticas tras la fusión. Los niveles muy altos y constantes de β-catenina no permiten la reprogramación, posiblemente debido a que se activan los mecanismos de control en el punto de control y actúan como reguladores negativos.

Figura 19. La sobre-expresión de Nanog y la activación de la ruta Wnt cooperan para aumentar la reprogramación de las células NS. Placas representativas y cuantificación (como veces de aumento del número de colonias) de las colonias híbridas de las fusiones PEG entre células EF4 pre-tratadas con BIO y

15 células NS-Oct4-(LV-Higro) como se indica. Las colonias se tiñeron con giemsa y se contaron. Las células EShigro se fusionaron con las células NS-Oct4-puro sin tratar (barras grises).

### Métodos

#### Células

20

Las células NS-Oct4-puro aisladas de ratones HP165 y que albergan las secuencias reguladoras del gen Oct4 de ratón que dirige GFP y los genes de resistencia a la puromicina fueron un regalo de Dr. A. Smith; se cultivaron como 25 se había descrito anteriormente (Conti et al., 2005). Los timocitos se aislaron de ratones de 6-8 semanas de edad. Las MEF resistentes a la higromicina se obtuvieron en el pasaje 3 (Millipore). Las células ES-neo y ES-higro se derivaron de E14Tg2a y se transdujeron con los vectores lentivirus pHRcPPT-PGK-Neomicina y pHRcPPT-PGK-Higromicina (Zito et al., 2005). Las células ES GSK3 DKO fueron un regalo de Dr. Doble, y se cultivaron como se había descrito anteriormente (Doble et al., 2007). Las células ES se cultivaron en gelatina en medio de Eagle modificado Dulbecco knock-out (DMEM) suplementado con un 20 % de suero fetal bovino (Hyclone), 1x aminoácidos 30 no esenciales, 1x GlutaMax, 1x 2-mercaptoetanol y 1.000 U/ml LIF ESGRO (Chemicon)

### Híbridos celulares

- Las fusiones PEG ES x NS y ES x MEF: 1,2 x 10<sup>6</sup> de células NS o MEF se colocaron en matraces T25. Tras 2 h, 1,2 35 x 10<sup>6</sup> células ES se colocaron dentro de estos, permitiendo que se unieran a las células NS o MEF. Tras otras 2 h, se añadió 1 ml de PEG 1450 al 50 % (p/v) (Sigma; pre-calentado a 37 °C) durante 2 minutos, y luego se lavaron las células tres veces con DMEM libre de suero. Finalmente, se cultivaron con medio completo celular ES con y sin 1 µM de BIO (Calbiochem), 100 ng/ml de Wnt3a (R&D) o 50-100 ng/ml de DKK1 (R&D). Tras 12 h, las células se tripsinizaron y se colocaron en placas de cultivo de gelatina+laminina tratada p100. Para la selección de ES x NS, se 40
- añadió puromicina tras 72 h, mientras que para la selección de ES x MEF, se añadieron higromicina más neomicina tras 24 h.

Fusiones ES x timocitos: las células se fusionaron en suspensiones como se había descrito anteriormente (Silva et 45 al., 2006). Tras la fusión, se compactaron por centrifugación y se desechó el sobrenadante. Las células aglomeradas se resuspendieron en medio completo celular ES y se pusieron en placas. La selección se llevó a cabo tras 24 h, utilizando higromicina más neomicina.

## Fusiones PEG ES pre-tratadas x NS

50

Se colocaron 1 x 10<sup>6</sup> células ES en placas p100 y se trataron durante 96, 72, 48, 24 y 12 h con 100 ng/ml de Wnt3a o 1 µM de BIO. El último día, las células se tripsinizaron, contaron, y se colocaron en placas sobre células NS para las fusiones o la recolección para los análisis de ARN y proteínas. Las fusiones PEG y la selección de fármacos se llevaron a cabo como se ha descrito previamente.

#### 55

### Diferenciación in vitro de células híbridas

El medio de diferenciación para la producción de cuerpos embrioides consistía en el medio de mantenimiento celular ES sin suplementación de LIF. Las células se recolectaron por tripsinización, se contaron, y se propagaron en gotas (400 células ES únicas/30 µl gota inicial) durante 2 días antes de transferirse a placas de cultivo bacteriano de 10

60 cm<sup>2</sup>. El día 5, los cuerpos embrioides se transfirieron a placas p100 gelatinizadas.

#### Producción de teratoma

Se tripsinizaron las células en suspensiones de una única célula y se resuspendieron en solución fosfato tamponada a una concentración de 1,5 x 10<sup>7</sup> células/ml. Estas células se inyectaron subcutáneamente en las extremidades traseras de ratones SCID Fox Chase utilizando una aguja de 25 gauges (200 µl). Los teratomas se recolectaron tras 4 semanas, y se fijaron, embebieron, seccionaron y tiñeron.

#### Construcción de plásmidos y células ES estables

- Se subclonaron β-catenina mutada de ratón en la serina 33, un amable regalo de Dr. de la Luna, y Axin2 de ratón (Chia y Constantini, 2005), un amable regalo de Dr. Constantini, en el vector vacío pCAG-C1 producido en el laboratorio que contenía, en orden de secuencia: promotor CAG, sitio de multiclonación, IRES, gen de resistencia a la neomicina y poliA. Las líneas celulares ES estables que expresaban β-catenina o Axin2 se aislaron tras nucleofección (Amaxa) de las dos construcciones y selección de fármacos con 250 µg/ml de neomicina.
- 15

20

5

#### Transferencia de Western

Se llevó a cabo la transferencia de Western como se había descrito previamente (Zito et al., 2007). Los anticuerpos primarios que se utilizaron eran: anti-β-catenina, clon 14 (BD Biosciences); anti-fosfo-β-catenina, S33/S37/T41 (nº 9561 Cell Signaling Technologies); anti-conductina sc-20784 (Santa Cruz); anti-APC, sc-895 (Santa Cruz); y anti-β-tubulina, clon D66, T0198 (Sigma).

#### Inmunotinción

- 25 Las células ES se lavaron dos veces con solución salina fosfato tamponada (PBS), se fijaron con un 4 % de paraformaldehído y se bloquearon en un 5 % de suero de cabra durante 40 min. Las células se incubaron con anti-β-catenina, clon 14 (BD Biosciences) durante 2 h y con un anticuerpo anti-ratón conjugado con fluoresceína durante 1 h. Las células se lavaron entonces y se montaron en portaobjetos con unas pocas gotas de Vectashield con DAPI (Vector Laboratories).
- 30

45

#### Transfecciones transitorias y actividad de luciferasa

Las células ES se co-transfectaron por nucleofacción (Amaxa) con la construcción indicadora Topflash que dirige el ADNc de luciferasa de luciérnaga y un pRI-CMV que dirige la expresión constitutiva de ADNc de renilla para la normalización. Se llevaron a cabo los tratamientos con Wnt3a y BIO el día después de la nucleofección y se lisaron las células con 1x tampón de lisis indicador pasivo. Las actividades indicadoras de luciérnaga y renilla se midieron utilizando un luminómetro basado en 96 pocillos y se detectaron según las instrucciones del fabricante (Promega Dual-Light system).

#### 40 Análisis RT-PCR semicuantitativa

Para la RT-PCR, se extrajo el ARN total de las células ES y de los cuerpos embrioides (200 cuerpos embrioides para cada clon y para cada punto de tiempo de diferenciación) utilizando el kit Rneasy (Qiagen), y se generó el ADNc utilizando superscript III (Invitrogen). Los cebadores que se utilizaron son:

Oct4: directo, GGCGTTCTCTTTGGAAAGGT-GTTC (SEC ID Nº 1): inverso, CTCGAACCACATCCTTCTCT (SEC ID Nº 2). directo, AGGGTCTGCTACTGAGAT-Nanog: GCTCTG (SEC ID Nº 3); inverso, CAACCACTGGTTTTTCT-GCCACCG (SEC ID Nº 4). Rex1: directo, GCCCTCGACAGACTGAC-CCTAA (SEC ID Nº 5); inverso, CTTCCTCAGGGCGGTTTTAC-CC (SEC ID Nº 6). directo, GACTACCTGCTGGGCCTCAA Fgf4: (SEC ID Nº 7); inverso, CGACACTCGGTTCCCCTTCT (SEC ID Nº 8). directo, GCGTGGGTATCAGAAGCACT Olig2: (SEC ID Nº 9);

	inverso, CCAGTCGGGTAAGAAACCAA (SEC ID Nº 10).
Blbp:	directo, GGGTAAGACCCGAGTTCCTC
	(SECIDIN-TI),
	(SEC ID № 12)
Axin2.	directo GGGAGCAGTTTTGTGGCAG-
/ (AII) 2.	CA (SEC ID N $^{\circ}$ 13):
	inverso, AGGGTCCTGGGTAAAT-
	GGGTGAG (SEC ID № 14)
C-Myc:	directo, TGCCGCCCACTCTC-
-	CCCAACC (SEC ID Nº 15);
	inverso, CCGCCGCCGTCATCGTCT-
	TCC (SEC ID Nº 16).
Brachyury:	directo, TGCTGCCTGTGAGTCATA
	(SEC ID № 17);
	inverso, ACAAGAGGCTGTAGAACATG
	(SEC ID Nº 18).
Nkx2.5:	directo, GCTCTCCTGCTTTCCCAGC
	(SEC ID Nº 19);
	inverso, CTCCCATCCCTACTGCCT-
	TCTGCAGC (SEC ID № 20).
AFP:	directo, TCCCTCATCCTCCTGCTA
	(SEC ID № 21);
	Inverso, GCACATICITCICCGICAC
0-1 1	(SEC ID № 22).
Cax 1:	
FOFF	(SEC ID IN- 24).
FGF5.	
	inverse CTTCAGTCTGTACTTCACTGG
	(SEC ID Nº 26)
GAPDH.	
	(SEC ID Nº 27).
	(SEC ID Nº 28).
CD4:	directo. CTGCGAGAGTTCCCAGAAGA
	(SEC ID № 33):
	inverso, TTCCTGTTCTCCAGCTCACA
	(SEC ID № 34);
CD8:	directo, GCTCAGTCAT-
	CAGCCAACTCG (SEC ID Nº 35);
	inverso, ATCACAGGCGAAGTCCAATC
	(SEC ID Nº 36);
Col1a1:	directo, GCAGACGGGAGTTTCTCCTC
	(SEC ID Nº 37);
	inverso, TCAAGCATACCTCGGGTTTC
	(SEC ID Nº 38);
Col1a2:	directo, CGACTAAGTTGGAGGGAACG
	(SEC ID Nº 39);
	inverso, CTTTGTCCACGTGGTCCTCT
	(SEC ID Nº 40).
GATA4:	directo, GTCGTAATGCCGAGGGTGA
	(SEC ID № 41);
	inverso, TCCTTCCGCATTGCAAGAG

#### (SEC ID Nº 42).

#### Secuenciación genómica con bisulfito

- Se llevó a cabo el tratamiento con bisulfito utilizando el Kit Epitect bisulfito (Qiagen), de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los productos amplificados se clonaron en el pCR2.1-TOPO (Invitrogen). Se secuenciaron diez clones elegidos aleatoriamente con los cebadores M13 directo y M13 inverso para cada gen, de la siguiente manera:
  - MeNanog: directo, GATTTTGTAGGTGGGAT-TAATTGTGAATTT (SEC ID N° 29); inverso, ACCAAAAAAACCCACACT-CATATCAATATA (SEC ID N° 30). MeOct4: directo, GGTTTTTTAGAGGATGGTT-GAGTG (SEC ID N° 31); inverso, TCCAACCCTACTAACCCAT-CACC (SEC ID N° 32).

#### 10 RT-PCR cuantitativa

El aislamiento de ARN y la transcripción inversa se llevaron a cabo como se ha descrito para la RT-PCR semicuantitativa. La matriz para cada reacción PCR era el ADNc que se obtenía de 16 ng de ARN total en un volumen de reacción de 25 µl. Se utilizó qPCix-UDG verde SYBR platino (Invitrogen) con la máquina de PCR en tiempo real ABprism 7000, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los cebadores que se utilizaron

eran:

15

NanogRT: directo, AACCAAAGGATGAAGT-GCAAGCGG (SEC ID Nº 43); inverso, TCCAAGTTGGGTTGGTC-CAAGTCT (SEC ID Nº 44).

Axin2 (adquirida, SuperArray Bioscience Corporation).

#### Análisis FACS 20

Se trataron o no las células ES-GFP con BIO durante 12, 24, 48, 72 y 96 h y posteriormente se fusionaron PEG con células NS-Oct4-puro. Los híbridos se tripsinizaron, contaron, se resuspendieron en PBS (1 x 10<sup>6</sup> células por punto) y se centrifugaron. Luego, se añadieron 0,1 ml de solución de paraformaldehído al 4 % a las células y se incubaron durante 15 min. Posteriormente, se añadió la solución de bloqueo (0,1 % Triton, 10 % de suero de cabra, en PBS) y se incubaron las células durante 1 h. Las células se marcaron entonces con α-nestina (1:100) (ab6142, Abcan) durante una noche. El día siguiente, las células se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con fluorocromo PE (1:50) (ab7002 Abcam) durante 1 h. Se llevaron a cabo los análisis FACS utilizando un citómetro FACSAria de BD Biosciences.

#### 30 Diferenciación de células híbridas in vitro

El medio de diferenciación para la producción de cuerpos embrioides consistía en el medio celular ES sin suplementación de LIF. Las células se recolectaron por tripsinización, se contaron y propagaron por gota a gota (400 células ES únicas/30 μl de gota inicial) durante 2 días antes de transferirse a placas de cultivo bacteriano de 10 cm<sup>2</sup>. El día 5, los cuerpos embrionarios se transfirieron a placas p100 gelatinizadas.

#### Expresión de Nanog

*Células* 40

Se derivaron células NS-Oct4-(LV-Higro) a partir de las NS-Oct4-puro y se transdujeron con el vector lentivírico pHRcPPT-PG-higromicina. Las células EF4 que tenían el promotor CAG que dirige el Nanog y los genes de resistencia a la puromicina fueron un regalo de Dr. I. Chambers. Las células se cultivaron como se había descrito previamente (Chambers et al., 2003).

45

35

Las fusiones PEG de células NS x ES-Higro o NS-Higro x EF4 se hicieron como se ha descrito previamente. Para la selección de NS x ES-Higro y NS x EF4, se añadieron puromicina más higromicina tras 72 h.

#### Resultados

La unión de los ligandos Wnt al receptor Frizzled da como resultado la inactivación de un complejo multiproteico compuesto por la glucógeno sintasa quinasa (GSK-3), Axin1, Axin2 y proteína de poliposis adenomatosa cólica (APC). La inactivación de GSK-3 da lugar a un descenso en la fosforilación de la β-catenina, que entonces se escapa de la degradación mediada por el proteosoma/ubiquitina (Willert y Jones, 2006). Como consecuencia, la β-catenina no degradada se acumula en el citoplasma y se traslada al núcleo, dando lugar a la activación

- catenina no degradada se acumula en el citoplasma y se traslada al nucleo, dando lugar a la acuvación transcripcional de una plétora de genes diana (Hoppler y Kavanagh 2007). Las células madre embrionarias cultivadas Wnt3a (ES) se pueden auto-renovar y permaneces totipotentes debido a la acumulación de β-catenina
   (Anton et al., 2007). Además, tanto la inactivación de los homólogos de *GSK-3a* y *GSK-3β* y las mutaciones en APC comprometen gravemente la capacidad de las células ES para diferenciarse (Doble et al., 2007, Kielman et al.,
- 10 (Anton et al., 2007). Además, tanto la inactivación de los homólogos de *GSK-3a* y *GSK-3β* y las mutaciones en APC comprometen gravemente la capacidad de las células ES para diferenciarse (Doble et al., 2007, Kielman et al., 2002). Es digno de mención que la regeneración de los folículos pilosos y de los progenitores cardiovasculares es dependiente de Wnt (Ito et al., 2007, Qyang et al., 2007). Estas observaciones dieron pie a los autores a determinar si la señalización Wnt/β-catenina es una ruta que puede dirigir la reprogramación de células somáticas.
- 15

5

#### La activación de la ruta Wnt/β-catenina potencia la reprogramación de células somáticas tras la fusión

Los autores utilizaron polietilenglicol (PEG) para generar híbridos entre células ES que expresaban constitutivamente el gen *NeoR*, y las células madre neurales de ratón (NS)-Oct4-puro/GFP (Silva et al., 2006) que expresan el gen *PuroR* y proteína fluorescente verde (GFP) bajo el control del elemento regulador *Oct4 (Pou5f1)* que solo es activo en células pluripotentes (Yeom et al., 1996). Inmediatamente tras la fusión, las células se cultivaron en gelatina (sin alimentadores que expresaran diferentes isoformas de Wnt (Dravid et al., 2005; Wiese et al., 2006)) durante 12, 24 y 48 h (Figura 1A) en presencia de una concentración optimizada de Wnt3a (100 ng/ml; Figura 2A). Los híbridos se seleccionaron en medio celular ES suplementado con puromicina; bajo estas condiciones de cultivo solo pueden crecer los clones reprogramados. El medio celular ES induce la diferenciación y detención del crecimiento de células NS, y por lo tanto también de los híbridos no reprogramados. Además, la puromicina

Las colonias resistentes se tiñeron por expresión de fosfatasa alcalina (AP), un marcador celular ES, y se contaron (Figura 1A). Estas células se habían reprogramado, ya que retenían el fenotipo redondeado de las células tipo ES y que expresan AP y Oct4-puro/GFP (Figura 1A, B). Los autores seleccionaron hasta 20 veces más de clones reprogramados con respecto al control tras 24 h de cultivo con Wnt3a. El número de clones reprogramados descendía tras 48 h de tratamiento, lo que indica que el cultivo prolongado con Wnt3a puede disminuir la eficacia de reprogramación.

proporciona una selección adicional para los clones reprogramados (Figura 3).

35

Estos datos mostraban claramente que el tratamiento con Wnt3a dependiente del tiempo aumenta mucho la capacidad de las células ES para reprogramar células NS.

Para apoyar estos datos, se obtuvo un número muy grande de clones reprogramados positivos a AP (entre 30 y 300)
 que mostraban un fenotipo tipo célula ES cuando se fusionaban fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) que expresan diferentes isoformas de Wnt (Dravid et al., 2005; Wiese et al., 2006) con células ES. Este número aumentaba hasta 5 veces cuando se cultivaban estos híbridos en presencia de Wnt3a durante 48 h (Figura 1C). Finalmente, para confirmar que la activación de la ruta Wnt/β-catenina aumenta la reprogramación celular somática, los autores inhibieron esta ruta con Dkk1, un inhibidor del receptor LRP6 (Logan y Nusse, 2004). El descenso sorprendente del número de clones positivos a AP reprogramados (hasta 6 veces; Figura 1C) demostraba que la

ruta de señalización Wnt/β-catenina estimula la reprogramación de células somáticas.

#### La inhibición transitoria de GSK3 en células ES aumenta su capacidad para reprogramar diferentes células somáticas

50

Para confirmar que la reprogramación celular aumenta con la activación de la ruta de señalización Wnt/ $\beta$ -catenina convencional, los autores decidieron inhibir transitoriamente la GSK-3 por adición al medio de cultivo del inhibidor selectivo de GSK-3, la 6-bromoindirrubin-3'-oxima (BIO) (Meijer et al., 2003). La inhibición de GSK-3 imita la activación de la ruta por medio de Wnt3a, ya que promueve la acumulación de  $\beta$ -catenina en el núcleo (Meijer et al.,

- 55 2003) y mantiene la pluripotencia de las células madre (Sato et al., 2004). Inicialmente, para excluir un papel directo de BIO en el aumento de la clonogenicidad y/o viabilidad de las células ES y los clones híbridos, los autores pusieron en placas un número escalado de células ES o híbridos en un medio que contenía BIO. Esto demostraba que la clonogenicidad y viabilidad tanto de las células ES como de los híbridos cultivados en ausencia y presencia de BIO, respectivamente, eran iguales (Figura 4A, B). Además, como la ruta Wnt/β-catenina está regulada por un
- 60 bucle de retroalimentación inhibidora (Ueno et al., 2007), los autores ensayaron diferentes concentraciones de BIO para determinar la concentración que imita esta regulación fisiológicamente más estrechamente: la adición de 1 μM de BIO daba lugar a la activación relativamente limitada del gen indicador Topflash (un vector que albergaba los sitios de unión de la β-catenina fusionados a luciferasa) y se parecía al nivel de actividad de la estimulación con Wnt3a (Figura 10A). Además, las concentraciones más altas de BIO eran ligeramente tóxicas para las células NS
- 65 (datos no mostrados). Por lo tanto los autores utilizaron 1 μM de BIO como referencia bajo las condiciones

#### experimentales restantes.

Los autores analizaron entonces los efectos del tratamiento con BIO en el transcurso del tiempo. Las células fusionadas PEG ES-neo x NS-Oct4-puro se cultivaron durante 12, 24, y 48 h con esta concentración optimizada de 5 BIO (1 µM; Figura 2B). Tras 24 h de tratamiento, los autores obtuvieron hasta 70 veces más de clones reprogramados (desde 200 a 1.500 de clones totales), con respecto al control (Figura 5A). La reprogramación era dependiente del tiempo de estimulación con BIO, con una disminución del número de clones reprogramados tras 48 h de tratamiento. Los híbridos seleccionados se reprogramaban ya que mostraban un fenotipo tipo ES, eran positivos a AP, y expresaban GFP-puro (Figura 5A, B). Sin embargo para excluir el papel del BIO como un 10 potenciador de la fusión celular, los autores llevaron a cabo más experimentos de control. El BIO no potenciaba la fusión mediada por PEG de células ES, ya que solo había un ligero aumento del número de clones tras la fusión de células ES-neo pre-tratadas con BIO con células ES-higro (Figura 6A). En la fusión de células ES x ES, los autores solo podían seleccionar híbridos y no clones reprogramados, y el número de clones que se obtenía era comparable. Además, para excluir de una mejor manera la posibilidad de que BIO tenía una actividad fusiogénica en diferentes tipos celulares, los autores fusionaron PEG células ES-neo x NS-Oct4-puro durante 3 horas y luego volvieron a 15 colocar los híbridos a una dilución tal que las células no tuvieran contacto entre ellas. Así, se añadió BIO al medio celular durante 12, 24, 48 y 72 h (Figura 6B). Los híbridos se formaron antes de la adición de BIO y no podían

aumentar ya que las células no se tocaban entre ellas. Aun así, sin embargo, los clones se seleccionaron con un pico a las 24 h del tratamiento con BIO (Figura 6B). Esto confirma además que BIO aumenta la reprogramación, y no
 20 la fusión, de células.

La inhibición de GSK-3 con BIO también aumentaba sorprendentemente el número de colonias reprogramadas cuando se fusionaban células MEF y timocitos con células ES. Las células híbridas PEG de ES-neo x MEF-higro y ES-higro x timocitos-neo se cultivaron en BIO durante 12, 24 y 48 h, y se seleccionaron por doble fármaco. Había hasta 20 veces (entre 200 y 1.500 clones totales) y nueve veces (entre 20 y 100 clones totales) de aumento, respectivamente, en el número de clones reprogramados seleccionados, con respecto a sus controles (fusiones en ausencia de BIO; Figura 5C, E). De nuevo, la eficiencia era más baja con el aumento del tiempo de tratamiento con BIO. Todos los clones seleccionados mostraban un fenotipo tipo ES y eran positivos a AP (Figura 5C-F).

30 Estos datos demuestran que la inhibición transitoria de GSK-3 aumenta mucho la capacidad de las células ES para reprogramar células somáticas. Además, esta reprogramación existe en un tiempo variable a lo largo de los diferentes tipos celulares.

# La estabilización cíclica de β-catenina en células ES aumenta su capacidad para reprogramar células NS 35

30

Los autores entonces se preguntaban si la activación de la ruta Wnt/β-catenina en células ES fortalecería y aumentaría su capacidad de reprogramación. Por lo tanto los autores investigaron si un aumento de la reprogramación se produce cuando se cultivan las células ES y/o NS con Wnt3a o BIO durante 12, 24, 48, 72 y 96 h, y se fusionan con células NS-Oct4-puro cultivadas en ausencia de BIO. Se apreciaron aumentos de hasta 15 veces

- 40 (aproximadamente 600 clones totales) u 80 veces (aproximadamente 2000 clones totales en el número de clones reprogramados cuando se pre-cultivaban las células ES durante 24 h y 96 h con Wnt3a o BIO, respectivamente (Figuras 7A y 9A); los clones seleccionados mostraban un fenotipo tipo célula ES, eran positivas a AP, y expresaban *Oct4* (Figuras 7A y 9A, B). Por el contrario, había un escaso aumento de reprogramación de NS con las células ES cultivadas con Wnt3a o BIO durante 12, 48 y 72 h. Para asegurar que el pre-tratamiento de células ES con BIO
- 45 antes de fusionarlas con células NS-Oct4-puro no aumentaba la fusión, las células fusionadas PEG se cultivaron durante 3 h, un tiempo para que se produzca la reprogramación, y se llevó a cabo un análisis FACS. Se apreciaba el mismo número de clones híbridos si las células ES se pre-trataban o no con BIO antes de la fusión, lo que excluía una actividad fusiogénica aumentada, dependiente de BIO (Figura 8). Los autores por lo tanto se preguntaban por gué había una onda parabólica de reprogramación a lo largo de los periodos de tratamiento Wnt3a y BIO. Esto
- 50 parece que se debe a la acumulación de β-catenina en las células tratadas con Wnt3a y BIO a las 24 h y 96 h (Figuras 7B y 9C), y su posterior localización en el núcleo celular en estos dos momentos del tratamiento (Figuras 7C y 9D). Estos datos muestran que la reprogramación puede desencadenarse solo tras la acumulación cíclica de β-catenina. Mientras que a las 12 h de tratamiento con Wnt3a o BIO no se acumulaba suficiente β-catenina para desencadenar la reprogramación, a las 24 h (y 96 h) de pre-tratamiento con Wnt3a y BIO de las células ES se
- 55 producía la acumulación de β-catenina; en los mismos momentos, se expresaban también Axin2, Dkk4 y APC, dando lugar a un bucle de retroalimentación negativa en la ruta Wnt/β-catenina (Bazzi et al., 2007; Doble et al., 2007; Jho et al., 2002; Lustig et al., 2002; Niida et al., 2004; Yan et al., 2001) que afectaba los momentos posteriores de 48 h y 72 h (Figuras 7B, D, E y 9C, E, F, y datos no mostrados). La ola de acumulación de β-catenina es similar en las células ES tratadas con Wnt3a y BIO. Esto puede ser debido a la baja concentración de BIO que se utiliza
- 60 aquí, que puede no inhibir la actividad de GSK-3 completamente, lo que se parece al bucle de regulación de retroalimentación en las células tratadas con Wnt3a. Además, con 1 μM de BIO, la cantidad de fosfo-β-catenina en células ES era mayor con respecto a las células tratadas con concentraciones crecientes de BIO, y además, la acumulación nuclear de la forma no fosforilada era bastante baja. Esto da lugar a la conclusión de que la GSK-3 no se inhibía completamente por 1 μM de BIO (Figura 10B, C). Para confirmar que el aumento de la expresión de Axin2
- 65 se evitaba con la reprogramación, los autores generaron clones ES estables que sobre-expresaban Axin2 (ES-

Axin2) y las fusionaron con células NS-Oct4-puro. Se seleccionaron los clones no reprogramados tras la fusión con cinco diferentes clones ES-Axin2 (Figura 11). En conclusión, la activación de la ruta Wnt/ $\beta$ -catenina es un mecanismo clave para la reprogramación de células somáticas, y solo cuando se acumula la  $\beta$ -catenina en las células ES en un cierto umbral pueden estas células reprogramar las células NS tras la fusión.

5

20

De manera notable, las células ES tratadas con Wnt3a y BIO expresaban los mismos niveles de genes pluripotentes *Nanog, Oct4, Rex1* y *Fgf4* en todos los momentos de tratamiento, mientras que la expresión de genes dependientes de  $\beta$ -catenina *Cdx1, Axin2* y *Dkk4* era cíclica de acuerdo con la acumulación de la misma proteína  $\beta$ -catenina (Figuras 7D, E y 9E, F). Es digno de mención que, aunque *c-Myc,* un conocido gen diana de  $\beta$ -catenina (He et al., 1909) babía demostrado provisionente que que actendo la conocido que para estre expressión inte con estre e

1998) había demostrado previamente que aumentaba la reprogramación cuando se sobre-expresaba junto con otros tres genes (Takahashi y Yamanaka, 2006), aquí se expresaba constantemente bajo los tratamientos con Wnt3a y BIO. Estos datos sugieren que el pretratamiento de las células ES con Wnt3a o BIO da como resultado la activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina y la expresión de genes diana específicos de β-catenina que a su vez, estimulan la reprogramación de células somáticas. Esta ruta es independiente de *Nanog, Oct4, Rex1, Fgf4 y c-Myc;* además, estos genes se expresaban a los mismos niveles durante los diferentes tratamientos con Wnt3a y BIO.

El pre-tratamiento alternativo de células NS con BIO daba lugar a la acumulación de β-catenina a las 24 h y las 72 h, pero proporcionaba escaso aumento de la reprogramación, con solo un ligero aumento en el número de clones tipo células ES, positivas a AP (Figura 9A y Figura 12). Por lo tanto la ruta de señalización Wnt/ β-catenina dirige un notable aumento de reprogramación de células somáticas solo cuando es activada en células ES.

A continuación, los autores querían caracterizar mejor el mecanismo de activación de reprogramación y asegurarse de que la  $\beta$ -catenina es un factor clave en el mecanismo de reprogramación de células somáticas. Los autores se preguntaban si las células ES que expresan niveles diferentes de  $\beta$ -catenina tienen diferentes capacidades de

- 25 reprogramación. Para esto, los autores generaron clones ES estables que sobre-expresaban diferentes niveles de la β-catenina estabilizada (ES-β-catenina) que albergan una mutación en uno de sus sitios de fosforilación dependiente del complejo de destrucción. Los autores seleccionaron cinco clones que activaban la expresión del gen indicador Topflash con diferentes grados de actividad, siendo E1 y F19 los menos activos, A13 y A12 con actividad intermedia, y C2 el más activo y el más similar a células ES GSK-3-/-, que acumulaban una cantidad constante y alta de β-
- 30 catenina (Doble et al., 2007) y activaba mucho Topflash (Figura 13A). Se generó un número muy alto de genes reprogramados (hasta 55 veces de aumento) tras la fusión de los clones E1 y F19 con células NS-Oct4-puro, se generó un número intermedio de clones reprogramados con la fusión de los clones A13 y A12 (hasta 18 veces de aumento), y casi no se seleccionaron clones tras la fusión del clon C2 y de células GSK-3-/- (Figura 13B). Es digno de mención que el clon E1 activaba el gen indicador Topflash con una extensión similar a la que se observaba en las
- 35 células tratadas 24 h con 1 μM de BIO o Wnt3a (Figura 13C), lo que da lugar a la conclusión de que estas células expresan niveles similares de β-catenina activa, y por lo tanto tienen capacidades de reprogramación comparables. Estos datos demuestran claramente que la reprogramación se produce solo cuando los niveles de β-catenina no son demasiado bajos ni demasiado altos; los niveles de β-catenina necesitan estar en un nivel fisiológico medio, que tienen los clones E1 y F19 y las células ES tratadas tanto con Wnt3a como con 1 μM de BIO.
- 40

### Los clones aislados se reprograman y se pueden diferenciar in vitro e in vivo

Para confirmar la pluripotencia, y por tanto el fenotipo tipo celular ES, se aislaron 21 clones reprogramados diferentes de la fusión de células ES pre-tratadas con BIO durante 24 h con NS-Oct4-puro. Todos los clones eran tetraploides (Figura 14A), eran positivos a GFP, y expresaban *Oct4, Nanog y Rex1* tras varias pasadas (Figura 14B). Por el contrario se anularon los genes neurales *Blbp y Olig2* (Figura 14C y Figura 15). De la misma manera, los híbridos reprogramados ES x timocitos y ES x MEF expresaban *Oct4 y Nanog* y perdían la expresión de *CD4* y *CD8,* y los marcadores específicos Col1a 1 y Col1a2, respectivamente (Figura 16A). Además, el análisis de la secuencia con bisulfito revelaba que en los clones reprogramados ES x NS, las islas CpG de los promotores *Nanog* y *Oct4*

- 50 estaban altamente desmetilados y eran comparables a las células ES, sugiriendo que estos dos loci tenían modificaciones epigenéticas masivas subyacentes; por el contrario las mismas CpG estaban altamente metiladas en las células NS parentales (Figura 14D). Estos datos muestran claramente que los híbridos aislados de las fusiones con células ES pre-tratadas con BIO se habían reprogramado.
- 55 A continuación, para determinar la capacidad de diferenciación de los clones reprogramados, los autores indujeron la diferenciación espontánea de ES x NS, ES x timocitos y ES x MEF. Los cuerpos embrioides que se formaban: eran estructuras con forma esférica claramente visibles tras 3 días y se diferenciaban tras 6 y 9 días (Figura 14E y Figura 16B). La expresión de *Oct4* (célula madre pluripotente), *AFP* (endodermo), *Brachyury* (mesodermo), *Nkx2.5* (músculo cardíaco) y *GATA4* (músculo cardíaco) se apreciaban a los 3, 5, 7 y 9 días de diferenciación, en sus
- 60 tiempos esperados (Boheler et al., 2002), y como era comparable con las células ES (Figura 14F y Figura 16C). Además, algunos de los clones comenzaban a palpitar espontáneamente, demostrando su diferenciación en cardiomiocitos.

Finalmente, para ensayar la capacidad de diferenciación de los híbridos ES x NS *in vivo*, los autores trasplantaron cinco clones diferentes subcutáneamente en ratones inmunodeficientes (SCID). Tres semanas tras la inyección, se apreciaban los teratomas (Figura 17). El examen histológico mostraba la presencia de tejido epitelial tipo intestinal (endodermo), músculo estriado y tejido adiposo (mesodermo), tejido neural, epidermis y cartílago (ectodermo) (Figura 14G).

5 Estos datos demostraban claramente la capacidad de diferenciación de los clones reprogramados, tanto in vitro como in vivo.

Los datos de los autores demuestran que la activación de la ruta de señalización Wnt/ β-catenina sin sobreexpresión de cualquiera de los genes de células ES conocidos puede controlar la reprogramación de células 10 somáticas. Además, en un sistema tanto con sobre-expresión de Nanog como activación de la ruta Wnt, la reprogramación de células NS está aumentada incluso más (Fig. 19), indicando que estas dos rutas pueden cooperar, pero permanecen distintas. Los autores han demostrado que la acumulación cíclica de β-catenina determina la reprogramación, imitando un escenario fisiológico que puede producirse in vivo. Por el contrario, la ganancia de función estable de β-catenina puede dar como resultado la formación de tumores (Katoh et al., 2007) o la incapacidad para reprogramar células que se diferencien tras la fusión (Doble et al., 2007, Kielman et al., 2002),

15 mientras que su pérdida de función puede dar como resultado el fallo de la reprogramación (Haegel et al., 1995).

Finalmente, los autores postulan que se puede activar un nuevo gen que es probablemente un factor epigenético que no se expresa constitutivamente en células ES por medio de la señalización Wnt/β-catenina, para activar una

20 cascada de eventos que desencadena la reprogramación del genoma de los núcleos somáticos. Los datos de los autores dan lugar a la hipótesis altamente especulativa y provocadora de que la regeneración de tejidos dañados puede iniciarse por medio de células madre "comandantes" que se activan por medio de la ruta Wnt/β-catenina y que son capaces de reprogramar células somáticas tras la fusión.

#### 25 Discusión

Los autores han demostrado en el presente documento que la activación transitoria de la ruta de señalización Wnt/βcatenina da lugar a la acumulación cíclica de β-catenina en células ES que las capacita para reprogramar células somáticas tras la fusión. Cuando, y solo cuando, se estabiliza un nivel específico de β-catenina y se traslada al

- núcleo, las células ES con capaces de reprogramar células diferenciadas; por el contrario, cuando se degrada la β-30 catenina, no se produce la reprogramación. Los niveles de β-catenina diferentes a lo largo del tiempo probablemente se deben a la expresión de algunas de sus dianas inhibidoras, tales como Axin2 y Dkk4, estabilizando el complejo de destrucción e inhibiendo los receptores Wnt, respectivamente. Se ha demostrado un bucle de retroalimentación negativa de la ruta de señalización Wnt/β-catenina en células ES diferenciadas, que puede dar como resultado
- 35 efectos tanto positivos como negativos en la cardiogénesis (Ueno et al., 2007). Además, los autores han demostrado que la sobre-expresión de Axin2 en las células ES afecta su capacidad de reprogramación. La acumulación periódica de β-catenina activa o bajas cantidades de una β-catenina mutante estabilizada es por lo tanto esencial para el proceso de reprogramación; por el contrario, altos niveles y estables de β-catenina afecta la capacidad de células ES para reprogramar células somáticas (Figura 7).
- 40

¿Por qué es tan importante el nivel y el tiempo de acumulación de β-catenina para la eficacia de reprogramación? Una ganancia de función estable de la  $\beta$ -catenina puede dar lugar a la formación de tumores (Katoh y Katoh, 2007). Además, las células ES GSK-3-/- que expresan establemente niveles de β-catenina no se diferencian (Doble et al., 2007; Kielman et al., 2002), y los autores han demostrado que estas células, como los clones que albergaban altas

- 45 actividades de β-catenina, no eran capaces de reprogramar células somáticas. Por otro lado, una pérdida de función de β-catenina tenía serios defectos en el desarrollo de ratones en estadio de gastrulación (Haegel et al., 1995; Huelsken et al., 2000) y las células ES β-catenina-/- no expresaban marcadores de células madre (Anton et al., 2007). Además los autores han demostrado en el presente documento que los niveles basales de β-catenina activa en las células ES pueden activar la reprogramación solo muy escasamente.
- 50

Por lo tanto, la pérdida de función y la ganancia de función de  $\beta$ -catenina son altamente tóxicas para las células, con graves efectos sobre su capacidad para diferenciarse y la capacidad para inducir la reprogramación. Por el contrario una activación transitoria de la señalización Wnt/β-catenina está regulada por un bucle de retroalimentación negativa que atenúa el nivel de B-catenina, lo que resulta en olas de su acumulación hasta un umbral específico, y la

55 inducción de la reprogramación.

> Una vez en el núcleo, la β-catenina activa diferentes genes diana (Katoh y Katoh, 2007). En el presente documento, los autores postulan que uno o más factores, los "reprogramadores" que no se expresan constitutivamente en células ES, se transcriben con la unión a la  $\beta$ -catenina, y activan una cascada de eventos que desencadenan la

60 reprogramación del genoma del núcleo somático. Esto se sugiere también por el hallazgo de que la reprogramación se produce en tiempos variables a través de los varios tipos celulares, lo que da lugar a la predicción de que la  $\beta$ catenina inicia un programa complejo de eventos que puede durar tiempos diferentes en los diferentes tipos celulares.

La reprogramación puede deberse a factores que tras-actúan que pueden desencadenar la transcripción y/o supresión de los genes específicos del núcleo somático, implicando que estos factores deben estar constantemente presentes para mantener el fenotipo no diferenciado. De manera alternativa, la inducción de una nueva modificación epigenética heredable del núcleo somático puede cambiar un programa, dando como resultado modificaciones

- 5 masivas en la cromatina. Sea el que sea el mecanismo, la transcripción del reprogramador por sí misma está ajustada finamente por puntos de control que regulan sus concentraciones; además, los altos niveles de β-catenina estabilizada en células GSK-3-/- o C2 que se habían saltado la inactivación del complejo de inactivación, abolían la capacidad de reprogramación de las células ES, dando lugar a los inventores a visualizar que hay sistemas de puntos de control alternativos que controlan las concentraciones de los reprogramadores que pueden entrar en acción.
- 10

En las células ES humanas y de ratón, el grupo de proteínas policombinadas (PcG) muestran una represión transcripcional de la expresión de genes de desarrollo, lo que por otra parte promovía la diferenciación (Boyer et al., 2006b; Lee et al., 2006). La estructura de cromatina de muchos de estos genes regulados por PcG contienen

- 15 modificaciones de "dominios bivalentes" que consisten tanto en inhibidores de la metilación de histona H3 lisina 27 y activación de las marcas de metilación de histona H3 lisina 4 (Bernstein et al., 2006). Además, los reguladores maestros de pluripotencia, como Oct4, Sox2 y Nanog, controlan genes que codifican los factores de transcripción, enzimas modificadoras de cromatina, y proteínas de transducción de señal, que regulan la auto-renovación de las células ES (Boyer et al., 2006a; Loh et al., 2006). Durante el proceso de reprogramación, uno o más programadores,
- como las dianas específicas de β-catenina, pueden iniciar las modificaciones del estado de la cromatina del núcleo 20 somático, resultando finalmente en el grado de pluripotentes, características genómicas tipo ES, que contienen modificaciones de dominios bivalentes reguladas por PcG y genes regulados por Oct4, Sox2 y Nanog.
- En cultivo, la generación de células madre pluripotentes inducidas (iPS) demuestra que la pluripotencia se puede 25 obtener por sobre-expresión de factores de transcripción definidos (Aasen et al., 2008; Aoi et al., 2008; Brambrink et al., 2008; Dimos et al., 2008; Hanna et al., 2008; Hockemeyer et al., 2008; Huangfu et al., 2008b; Kim et al., 2008; Lowry et al., 2008; Maherali et al., 2008; Maherali et al., 2007; Park et al., 2008a; Park et al., 2008b; Stadtfeld et al., 2008a; Stadtfeld et al., 2008b; Takahashi et al., 2007; Takahashi y Yamanaka, 2006; Wernig et al., 2008; Yu et al., 2007), incluyendo los genes de células madre; sin embargo, este proceso probablemente no se produce in vivo ya
- que los factores como Nanog, Oct4 y Sox2 no se expresan en tejidos adultos o en células madre somáticas adultas 30 y ya que son indispensables para la función de células madre adultas (Lengner et al., 2007). Por otro lado, la sobreexpresión de una mezcla de estos factores de transcripción es una receta potente para la generación de nuevas células madre en cultivo lo que será esperanzadoramente un recurso potente para aplicaciones médicas. Los datos de los inventores demuestran que la activación transitoria y periódica de la ruta de señalización Wnt/β-catenina sin
- 35 sobre-expresión de cualquiera de los genes celulares ES conocidos puede controlar la reprogramación de células somáticas, imitando un escenario fisiológico que puede producirse in vivo. Sorprendentemente, las células hepáticas de ratón adulto expresan altos niveles de β-catenina, y parece que la eficacia de selección de hepatocitos-iPS es mayor con respecto a los fibroblastos iPS, incluso si el número de integraciones retrovíricas de los factores de reprogramación es menor en las células hepáticas (Aoi et al., 2008). Estos hallazgos indican que la señalización Wnt
- 40 puede aumentar la generación de células iPS. Esto lo demostró recientemente Marson et al. (2008), donde ellos demostraron que las líneas iPS se podían aislar con alta eficacia a partir de células MEF transducidas con lentivirus que codifican Oct4, Sox2 y Klf4 y cultivadas en Wnt3a-CM (medio acondicionado Wnt3a). Digno de mención y de acuerdo con los datos de los inventores, Marson et al., (2008) demostró que los mecanismos mediados por Wnt de reprogramación es independiente de c-Myc. Sin embargo, no fueron capaces de reproducir los efectos de Wnt3a-CM
- 45 sobre la reprogramación con inhibidores de GSK-3. Esto se debía potencialmente al cultivo prolongado en un medio que contenía inhibidores, que como muestran los autores en el presente documento, tiene efectos negativos en la reprogramación.
- Los clones reprogramados aislados se pueden diferenciar in vivo e in vitro. El proceso para conseguir la 50 reprogramación completa es lento, como se ha visto en células iPS en que las cantidades detectables de GFP se expresan semanas después de la selección con antibióticos (Jaenisch y Young, 2008). Resulta interesante, en el presente estudio, que los híbridos seleccionaron se reprogramaron completamente pronto mientras se seleccionaban por el fármaco, ya que expresaban altos niveles de GFP y puromicina al mismo tiempo.
- 55 Finalmente surge una cuestión: ¿Puede producirse la reprogramación mediada por la señalización Wnt de células somáticas en la fusión celular espontánea? Se ha demostrado la fusión independiente de PEG en diferentes tipos celulares, pero es un evento muy raro (Ogle et al., 2005). Esto es probablemente debido a que la mayoría de los híbridos formados son forzados a someterse a la diferenciación bajo las condiciones de cultivo que se utilizan. Será interesante en el futuro determinar si se puede aumentar la reprogramación de células fusionadas espontáneamente
- 60 por activación de la ruta de señalización Wnt/β-catenina. Este puede representar el punto de partida para explorar si puede producirse la reprogramación de células fusionadas espontáneamente en organismos vivos.

#### Referencias

65 Aasen, T., Raya, A., Barrero, M. J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V.,

Tiscornia, G., et al. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. Nat Biotechnol 26, 1276-1284.

Anton, R., Kestler, H. A., y Kuhl, M. (2007). beta-Catenin signaling contributes to sternness and regulates early differentiation in murine embryonic stem cells. FEBS Lett 581, 5247-5254.

- 5 Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., y Yamanaka, S. (2008). Generation of Pluripotent Stem Cells from Adult Mouse Liver and Stomach Cells. Science. Bazzi, H., Fantauzzo, K. A., Richardson, G. D., Jahoda, C. A., y Christiano, A. M. (2007). The Wnt inhibitor, Dickkopf 4, is induced by canonical Wnt signaling during ectodermal appendage morphogenesis. Dev Biol 305, 498-507.
- 10 Behrens, J. (2005). The role of the Wnt signalling pathway in colorectal tumorigenesis. Biochem Soc Trans 33, 672-675.

Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., Fry, B., Meissner, A., Wernig, M., Plath, K., et al. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. Cell 125, 315-326.

- Boheler, K. R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H. T., Anisimov, S. V., y Wobus, A. M. (2002). Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into cardiomyocytes. Circ Res 91, 189-201.
   Boyer, L. A., Mathur, D., y Jaenisch, R. (2006a). Molecular control of pluripotency. Curr Opin Genet Dev 16, 455-462.
- Boyer, L. A., Plath, K., Zeitlinger, J., Brambrink, T., Medeiros, L. A., Lee, T. I., Levine, S. S., Wernig, M., Tajonar,
  A., Ray, M. K., et al. (2006b). Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. Nature 441, 349-353.
  Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G. G., Lengner, C. J., Wernig, M., Suh, H., y Jaenisch, R. (2008).

Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G. G., Lengner, C. J., Wernig, M., Sun, H., y Jaenisch, R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. Cell Stem Cell 2, 151-159.

- Chia, I. V., y Costantini, F. (2005). Mouse axin and axin2/conductin proteins are functionally equivalent *in vivo*. Mol Cell Biol 25, 4371-4376.
   Cole, M. F., Johnstone, S. E., Newman, J. J., Kagey, M. H., y Young, R. A. (2008). Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. Genes Dev 22, 746-755.
- Conti, L., Pollard, S. M., Gorba, T., Reitano, E., Toselli, M., Biella, G., Sun, Y., Sanzone, S., Ying, Q. L., Cattaneo,
   E., y Smith, A. (2005). Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. PLoS Biol 3, e283.

Cowan, C. A., Atienza, J., Melton, D. A., y Eggan, K. (2005). Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. Science 309, 1369-1373.

Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G.,
 Leibel, R., Goland, R., et al. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. Science 321, 1218-1221.

Doble, B. W., Patel, S., Wood, G. A., Kockeritz, L. K., y Woodgett, J. R. (2007). Functional redundancy of GSK-3alpha and GSK-3beta in Wnt/betacatenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines. Dev Cell 12, 957-971.

40 Dravid, G., Ye, Z., Hammond, H., Chen, G., Pyle, A., Donovan, P., Yu, X., y Cheng, L. (2005). Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. Stem Cells 23, 1489-1501.

Gurley, K. A., Rink, J. C., y Sanchez Alvarado, A. (2008). Beta-catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. Science 319, 323-327.

- Haegel, H., Larue, L., Ohsugi, M., Fedorov, L., Herrenknecht, K., y Kemler, R. (1995). Lack of betacatenin affects mouse development at gastrulation. Development 121, 3529-3537.
  Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B. W., Beard, C., Wernig, M., Creyghton, M. P., Steine, E. J., Cassady, J. P., Foreman, R., et al. (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. Cell 133, 250-264.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., y Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. Science 281, 1509-1512.
   Hockemeyer, D., Soldner, F., Cook, E. G., Gao, Q., Mitalipova, M., y Jaenisch, R. (2008). A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency. Cell Stem Cell 3, 346-353
   Hoppler, S., y Kavanagh, C. L. (2007). Wnt signalling: variety at the core. J Cell Sci 120, 385-393.
- 55 Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A. E., y Melton, D. A. (2008a). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. Nat Biotechnol 26, 795-797.

Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., y Melton, D. A. (2008b). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. Nat
Biotechnol 26, 1269-1275

Huelsken, J., Vogel, R., Brinkmann, V., Erdmann, B., Birchmeier, C., y Birchmeier, W. (2000). Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. J Cell Biol 148, 567-578.

Ito, M., Yang, Z., Andl, T., Cui, C., Kim, N., Millar, S. E., y Cotsarelis, G. (2007). Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. Nature 447, 316-320.

5 Jaenisch, R., y Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. Cell 132, 567-582. Jho, E. H., Zhang, T., Domon, C., Joo, C. K., Freund, J. N., y Costantini, F. (2002). Wnt/beta-catenin/Tcf signaling induces the transcription of Axin2, a negative regulator of the signaling pathway. Mol Cell Biol 22, 1172-1183. Karner, C., Wharton, K. A., y Carroll, T. J. (2006). Apical-basal polarity, Wnt signaling and vertebrate organogenesis. Semin Cell Dev Biol 17, 214-222.

5 Katoh, M., y Katoh, M. (2007). WNT signaling pathway and stem cell signaling network. Clin Cancer Res 13, 4042-4045. Kawano, Y., y Kypta, R. (2003). Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. J Cell Sci 116, 2627-2634.

10

15

- Kielman, M. F., Rindapaa, M., Gaspar, C., van Poppel, N., Breukel, C., van Leeuwen, S., Taketo, M. M., Roberts, S., Smits, R., y Fodde, R. (2002). Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. Nat Genet 32, 594-605.

Kikuchi, A., Yamamoto, H., y Kishida, S. (2007). Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors. Cell Signal 19, 659-671.

Kim, J. B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Arauzo-Bravo, M. J., Ruau, D., Han, D. W., Zenke, M., v Scholer, H. R. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. Nature.

Lee, T. I., Jenner, R. G., Boyer, L. A., Guenther, M. G., Levine, S. S., Kumar, R. M., Chevalier, B., Johnstone, S. E., Cole, M. F., Isono, K., et al. (2006). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. Cell 125, 301-313.

Lengner, C. J., Camargo, F. D., Hochedlinger, K., Welstead, G. G., Zaidi, S., Gokhale, S., Scholer, H. R., Tomilin, 20 A., y Jaenisch, R. (2007). Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. Cell Stem Cell 1, 403-415.

Logan, C. Y., y Nusse, R. (2004). The Wnt signaling pathway in development and disease. Annu Rev Cell Dev Biol 20, 781-810.

Loh, Y. H., Wu, Q., Chew, J. L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., Bourgue, G., George, J., Leong, B., Liu, J., et 25 al. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. Nat Genet 38, 431-440.

Lowry, W. E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A. D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A. T., y Plath, K. (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 2883-2888.

30 Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., van de Wetering, M., Clevers, H., Schlag, P. M., Birchmeier, W., y Behrens, J. (2002). Negative feedback loop of Wnt signaling through upregulation of conductin/axin2 in colorrectal and liver tumors. Mol Cell Biol 22, 1184-1193. Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J.,

Jaenisch, R., et al. (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. Cell Stem Cell 1, 55-70. 35

Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., y Hochedlinger, K. (2008). A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell 3, 340-345.

Marson, A., Foreman, R., Chevalier, B., Bilodeau, S., Kahn, M., Young, R. A., y Jaenisch, R. (2008). Wht signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. Cell Stem Cell 3, 132-135.

40 Meijer, L., Skaltsounis, A. L., Magiatis, P., Polychronopoulos, P., Knockaert, M., Leost, M., Ryan, X. P., Vonica, C. A., Brivanlou, A., Dajani, R., et al. (2003). GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. Chem Biol 10, 1255-1266.

Niida, A., Hiroko, T., Kasai, M., Furukawa, Y., Nakamura, Y., Suzuki, Y., Sugano, S., y Akiyama, T. (2004). DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. Oncogene 23, 8520-8526.

45 Ogle, B. M., Cascalho, M., y Platt, J. L. (2005). Biological implications of cell fusion. Nat Rev Mol Cell Biol 6, 567-575.

Osakada, F., Ooto, S., Akagi, T., Mandai, M., Akaike, A., y Takahashi, M. (2007). Wnt signaling promotes regeneration in the retina of adult mammals. J Neurosci 27, 4210-4219.

Park, I. H., Zhao, R., West, J. A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T. A., Lerou, P. H., Lensch, M. W., y Daley, G. Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. Nature 451, 141-146.

50 Petersen, C. P., y Reddien, P. W. (2008). Smedbetacatenin-1 is required for anteroposterior blastema polarity in planarian regeneration. Science 319, 327-330.

Reya, T., y Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. Nature 434, 843-850.

- Reya, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., y Weissman, I. L. 55 (2003). A role for Wnt signalling in selfrenewal of haematopoietic stem cells. Nature 423, 409-414.
- Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P., and Brivanlou, A. H. (2004). Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. Nat Med 10, 55-63.

Silva, J., Chambers, I., Pollard, S., y Smith, A. (2006). Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. Nature 441, 997-1001. 60

Stadtfeld, M., Brennand, K., y Hochedlinger, K. (2008a). Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. Curr Biol 18, 890-894.

Stoick-Cooper, C. L., Moon, R. T., y Weidinger, G. (2007). Advances in signaling in vertebrate regeneration as a prelude to regenerative medicine. Genes Dev 21, 1292-1315.

. Tada, M., Tada, T., Lefebvre, L., Barton, S. C., y Surani, M. A. (1997). Embryonic germ cells induce epigenetic 65 reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. Embo J 16, 6510-6520.

Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells. Curr Biol 11, 1553-1558.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., y Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. Cell.

- 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.
   Ueno, S., Weidinger, G., Osugi, T., Kohn, A. D., Golob, J. L., Pabon, L., Reinecke, H., Moon, R. T., y Murry, C. E. (2007). Biphasic role for Wnt/betacatenin signaling in cardiac specification in zebrafish and embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 104, 9685-9690.
- Vajta, G. (2007). Somatic cell nuclear transfer in its first and second decades: successes, setbacks, paradoxes and perspectives. Reprod Biomed Online 15, 582-590.
   Wernig, M., Lengner, C. J., Hanna, J., Lodato, M. A., Steine, E., Foreman, R., Staerk, J., Markoulaki, S., and Jaenisch, R. (2008). A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. Nat Biotechnol 26, 916-924.
- 15 Wharton, K. A., Jr., Zimmermann, G., Rousset, R., and Scott, M. P. (2001). Vertebrate proteins related to Drosophila Naked Cuticle bind Dishevelled and antagonize Wnt signaling. Dev Biol 234, 93-106. Wiese, C., Rolletschek, A., Kania, G., Navarrete-Santos, A., Anisimov, S. V., Steinfarz, B., Tarasov, K. V., Brugh, S. A., Zahanich, I., Ruschenschmidt, C., et al. (2006). Signals from embryonic fibroblasts induce adult intestinal epithelial cells to form nestinpositive cells with proliferation and multilineage differentiation capacity *in vitro*. Stem
- Cells 24, 2085-2097.
   Willert, K., y Jones, K. A. (2006). Wnt signaling: is the party in the nucleus? Genes Dev 20, 1394-1404.
   Yan, D., Wiesmann, M., Rohan, M., Chan, V., Jefferson, A. B., Guo, L., Sakamoto, D., Caothien, R. H., Fuller, J. H., Reinhard, C., et al. (2001). Elevated expression of axin2 and hnkd mRNA provides evidence that Wnt/beta catenin signaling is activated in human colon tumors. Proc Natl Acad Sci U S A 98, 14973-14978.
- 25 Yeom, Y. I., Fuhrmann, G., Ovitt, C. E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., Hubner, K., y Scholer, H. R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. Development 122, 881-894.

Yokoyama, H., Ogino, H., Stoick-Cooper, C. L., Grainger, R. M., y Moon, R. T. (2007). Wnt/betacatenin signaling has an essential role in the initiation of limb regeneration. Dev Biol 306, 170-178.

30 Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. Science.

Zito, E., Fraldi, A., Pepe, S., Annunziata, I., Kobinger, G., Di Natale, P., Ballabio, A., y Cosma, M. P. (2005). Sulphatase activities are regulated by the interaction of sulphatase-modifying factor 1 with SUMF2. EMBO Rep 6, 655-660.

Zito, E., Buono, M., Pepe, S., Settembre, C., Annunziata, I., Surace, E. M., Dierks, T., Monti, M., Cozzolino, M., Pucci, P., et al. (2007). Sulfatase modifying factor 1 trafficking through the cells: from endoplasmic reticulum to the endoplasmic reticulum. Embo J 26, 2443-2453.

40 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fondazione Telethon Cosma, Maria Pia Lluis Vinas, Frederic

45

35

<120> Método para reprogramar células diferenciadas

<130> BE 101669

50 <160>44

<170> PatentIn versión 3.5

- <210> 1
  55 <211> 24
  <212> ADN
  <213> Secuencia artificial
- <220> 60 <223> Cebador sintético <400> 1

ggcgttctct ttggaaaggt gttc 24

65 <210>2 <211>20

	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 2 ctcgaaccac atccttctct	20
10	<210> 3 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador sintético	
00	<400> 3 agggtctgct actgagatgc tctg	24
20	<210> 4 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador sintético	
30	<400> 4 caaccactgg tttttctgcc accg	24
35	<210> 5 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
40	<400> 5 gccctcgaca gactgaccct aa	22
45	<210> 6 <211> 22 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador sintético	
50	<400> 6 cttcctcagg gcggttttac cc	22
55	<210> 7 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 7 gactacctgc tgggcctcaa	20
65	<210> 8 <211> 20	

	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 8 cgacactcgg ttccccttct	20
10	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador sintético	
20	<400> 9 gcgtgggtat cagaagcact	20
20	<210> 10 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador sintético	
30	<400> 10 ccagtcgggt aagaaaccaa	20
35	<210> 11 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
40	<400> 11 gggtaagacc cgagttcctc	20
45	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador sintético	
50	<400> 12 atcaccactt tgccaccttc	20
55	<210> 13 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 13 gggagcagtt ttgtggcagc a	21
65	<210> 14 <211> 23	

	<212> ADN <213> Secuencia artificial		
5	<220> <223> Cebador sintético		
	<400> 14 agggtcctgg gtaaatgggt gag		23
10	<210> 15 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
15	<220> <223> Cebador sintético		
20	<400> 15 tgccgcccac tctccccaac c		21
20	<210> 16 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
25	<220> <223> Cebador sintético		
30	<400> 16 ccgccgccgt catcgtcttc c		21
35	<210> 17 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Cebador sintético		
40	<400> 17 tgctgcctgt gagtcata	18	
45	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
50	<220> <223> Cebador sintético		
50	<400> 18 acaagaggct gtagaacatg		20
55	<210> 19 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
60	<220> <223> Cebador sintético		
	<400> 19 gctctcctgc tttcccagc		19
65	<210> 20 <211> 26		

	<212> ADN <213> Secuencia artificial		
5	<220> <223> Cebador sintético		
	<400> 20 ctcccatccc tactgccttc tgcagc		26
10	<210> 21 <211> 18 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
15	<220> <223> Cebador sintético		
20	<400> 21 tccctcatcc tcctgcta	18	
20	<210> 22 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
25	<220> <223> Cebador sintético		
30	<400> 22 gcacattctt ctccgtcac		19
35	<210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Cebador sintético		
40	<400> 23 tctacacaga ccaccaacgc		20
45	<210> 24 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
F0	<220> <223> Cebador sintético		
50	<400> 24 agaaactcct ccttgacggg		20
55	<210> 25 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
60	<220> <223> Cebador sintético		
	<400> 25 aaagtcaatg gctcccacga a		21
65	<210> 26 <211> 21		

	<212> ADN <213> Secuencia artificial		
5	<220> <223> Cebador sintético		
	<400> 26 cttcagtctg tacttcactg g	21	
10	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
15	<220> <223> Cebador sintético		
00	<400> 27 actcccactc ttccaccttc	20	
20	<210> 28 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
25	<220> <223> Cebador sintético		
30	<400> 28 tcttgctcag tgtccttgc 19		
35	<210> 29 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
	<220> <223> Cebador sintético		
40	<400> 29 gattttgtag gtgggattaa ttgtgaattt		30
45	<210> 30 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
50	<220> <223> Cebador sintético		
50	<400> 30 accaaaaaaa cccacactca tatcaatata		30
55	<210> 31 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial		
60	<220> <223> Cebador sintético		
	<400> 31 ggttttttag aggatggttg agtg	24	
65	<210> 32 <211> 23		

	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> Cebador sintético	
	<400> 32 tccaacccta ctaacccatc acc	23
10	<210> 33 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> Cebador sintético	
20	<400> 33 ctgcgagagt tcccagaaga	20
20	<210> 34 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Cebador sintético	
30	<400> 34 ttcctgttct ccagctcaca	20
35	<210> 35 <211> 21 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador sintético	
40	<400> 35 gctcagtcat cagccaactc g	21
45	<210> 36 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador sintético	
50	<400> 36 atcacaggcg aagtccaatc	20
55	<210> 37 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> cebador sintético	
	<400> 37 gcagacggga gtttctcctc	20
65	<210> 38 <211> 20	

	<212> ADN <213> Secuencia artificial	
5	<220> <223> cebador sintético	
	<400> 38 tcaagcatac ctcgggtttc	20
10	<210> 39 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> cebador sintético	
20	<400> 39 cgactaagtt ggagggaacg	20
20	<210> 40 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> cebador sintético	
30	<400> 40 ctttgtccac gtggtcctct	20
35	<210> 41 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> cebador sintético	
40	<400> 41 gtcgtaatgc cgagggtga	19
45	<210> 42 <211> 19 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> cebador sintético	
50	<400> 42 tccttccgca ttgcaagag	19
55	<210> 43 <211> 24 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> cebador sintético	
	<400> 43 aaccaaagga tgaagtgcaa gcgg	
65	<210> 44 <211> 24	

24

<212> ADN <213> Secuencia artificial

<220> <223> cebador sintético

<400> 44 tccaagttgg gttggtccaa gtct 24

5

#### REIVINDICACIONES

 Un método *in vitro* para reprogramar una célula diferenciada aislada en una célula madre indiferenciada, que comprende la etapa de fusionar dicha célula diferenciada con una célula pluripotente aislada, en donde dicha célula pluripotente aislada se trata *in vitro* con una cantidad adecuada de activador de la ruta Wnt/ β-catenina que es al menos una isoforma de la proteína Wnt o un inhibidor de la glucógeno sintasa quinasa-3.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que la célula pluripotente aislada se trata *in vitro* antes o después de la etapa de fusión de dicha célula diferenciada con dicha célula pluripotente.

10

35

5

3. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la célula diferenciada se selecciona de entre el grupo de: célula somática, célula madre neural, fibroblasto embrionario, timocito.

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la célula pluripotente aislada se
 15 selecciona de entre el grupo de: célula madre adulta, célula madre embrionaria.

5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la célula pluripotente aislada es una célula de ratón o una célula humana y la célula diferenciada es una célula de ratón o humana.

20 6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la isoforma de Wnt se selecciona de entre el grupo de: Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11 o Wnt16.

7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que el inhibidor de la glucógeno
 sintasa quinasa-3 es BIO o CHIR99021 o un análogo de los mismos.

8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende además la sobreexpresión de la proteína Nanog en la célula pluripotente aislada.

30 9. El método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 7 que comprende además la sobre-expresión de la proteína Nanog en la célula fusionada.

10. El método de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9 en el que la sobre-expresión de la proteína Nanog se obtiene modificando genéticamente la célula pluripotente aislada o la célula fusionada o transduciendo la célula pluripotente aislada o la célula fusionada con un vector apropiado.



Fig. 1

а Número de colonias reprogramadas 25 20 (veces de cambios) 15 10 5 0 Wnt3a 100ng/ml Wnt3a 50ng/ml Control b Número de colonias reprogramadas 60 50 (veces de cambios) 0 0 0 0 0 0 ΒΙΟ 1μΜ ΒΙΟ 5μΜ ΒΙΟ 2μΜ Control

Fig. 2

29



Fig. 3



Fig. 4

ES 2 539 125 T3



Fig. 5





Fig. 6





NS-Nestina

Fig. 8

ES 2 539 125 T3



Fig. 9





Fig. 10



Fig. 11

ES 2 539 125 T3



Fig. 12









Fig. 16



Fig. 17

ES 2 539 125 T3



Fig. 18

ES 2 539 125 T3



Fig. 19