

FUNDACIÓN DOMINGO MARTÍNEZ

AYUDAS A LA INVESTIGACIÓN 2017

MEMORIA DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN – Final

TÍTULO DEL PROYECTO

Contribución de la modificación metabólica a la reprogramación celular y la transformación oncogénica

INVESTIGADOR SOLICITANTE

María Paz de Miguel González

DATOS DE CONTACTO

Teléfono 91-2071458

Correo electrónico mariapdemiguel@gmail.com

CENTRO Instituto de Investigaciones Sanitarias del Hospital Universitario La Paz, Edificio IDIPAZ, planta 4.

Persona de contacto en el centro: Ana Coloma

Teléfono y correo-e: 91-7277576 fundación.hulp@salud.madrid.org

PALABRAS CLAVE: Oncogénesis, hipoxia, reprogramación celular, proliferación, metabolismo

Resumen técnico del proyecto:

De forma notable, los modelos de transformación oncogénica in vitro son muy similares a los de reprogramación celular. En la formación de focos oncogénicos clásica, la transducción de fibroblastos con Klf4 y cMyc promueve la autorenovación ilimitada, mientras que para la reprogramación celular hay que añadir a estos dos genes Oct4 y Sox2. Otras similitudes incluyen el cambio metabólico desde fosforilación oxidativa a glicolisis, el consumo incrementado de glucosa, la variación del número de mitocondrias y la transición epitelio-mesénquima. Es remarcable que los pacientes que sufren hipoxia crónica como consecuencia de diversas enfermedades tienen una mayor incidencia de tumores, pero no se ha descrito una causa primaria común a todos ellos. Estos datos nos llevan a testar la hipótesis de si las condiciones hipóxicas a las que están sometidas estas células en modelos fisiológicos las hacen más propensas a reprogramación celular y/o transformación oncogénica. Nuestra hipótesis es que la reprogramación celular y la transformación oncogénica son procesos relacionados cuyos mecanismos pueden ser elucidados por medio de modelos de modificación metabólica. El objetivo del proyecto es caracterizar

la contribución de la respuesta a la hipoxia a ambos procesos en modelos fisiológicos. Para ello induciremos reprogramación celular y transformación oncogénica en células de pacientes con hipoxia crónica tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica, así como de controles jóvenes y sanos de forma paralela. Se comparará la eficiencia de la transformación entre los diferentes grupos de pacientes y en condiciones de normoxia o hipoxia. A continuación por medio de RNA-seq se discernirán los mecanismos moleculares involucrados en la reprogramación celular y la transformación oncogénica por modificación metabólica, y se intentará transferir este conocimiento a generar protocolos clínicos del uso del O₂ medicinal como preventivo de tales transformaciones en enfermedades que cursan con baja presión sanguínea de oxígeno.

MEMORIA FINAL

1. **Método de sobreexpresión de los factores.** Aunque en un principio el método propuesto era de tipo integrativo por medio de la introducción de los factores Oct4, Klf4, cMyc y Sox2 por medio de retrovirus, por motivos de seguridad biológica se decidió usar un método no integrativo como los vectores episomales (Figura 1), junto con transfección por nucleofección. De esta manera se evita el uso de retrovirus con afinidad por células humanas que contienen además varios oncogenes humanos (cMyc y Klf4) y se evitan riesgos de infección. Queremos destacar que esto conlleva desafortunadamente una menor eficiencia de reprogramación (0,001%-0,003% respecto a un 0,02% con retrovirus), debido a la esperada baja eficiencia de transfección que puede ser alcanzada en células sanguíneas humanas.

Vectores episomales empleados

<p>MOS: vector episomal expresando Oct4 y Sox2</p>	<p>MMK: vector episomal expresando Klf4 y cMyc</p>	<p>pmax-GFP: plásmido expresando la proteína fluorescente verde (GFP)</p>
--	--	---

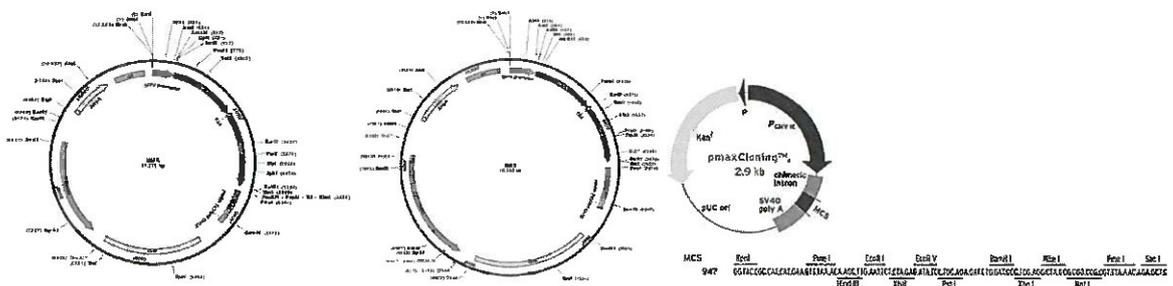


Figura 1. Detalle gráfico de los vectores episomales empleados. Para la generación de focos oncogénicos (OF) se emplea el vector MMK, que contiene los genes Klf4 y cMyc. Para la generación de iPSC además del MMK se emplea el vector MOS, que contiene los genes Oct4 y Sox2. Además en ambos casos se incluyó el pmax-GFP que contiene la proteína fluorescente verde como gen reportero de la eficiencia de transfección.

2. **Tipos celulares a reprogramar.** Se utilizaron tres tipos celulares: Células mononucleares de la sangre (PBMCs), Células mesenquimales de la grasa (SVF) y Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) para establecer un protocolo estándar en el cual fuera posible una comparación de la eficiencia de reprogramación en normoxia versus hipoxia y entre los diferentes tipos de pacientes. En particular se pretendía establecer primero si había diferencias en la eficiencia de transfección entre tipos celulares y también si ésta estaba o no influenciada por las condiciones de normoxia o de hipoxia. El método de aislamiento celular así como el aspecto microscópico de los diferentes tipos celulares empleados se muestran en la Tabla 1.

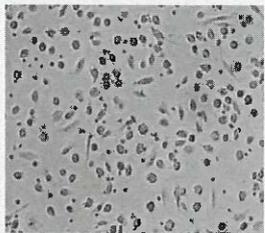
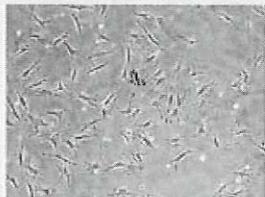
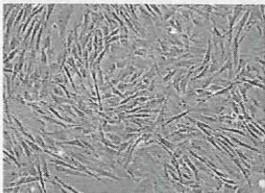
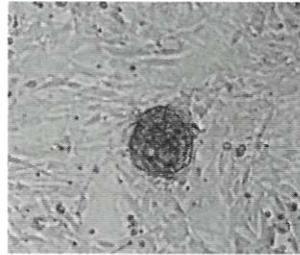
Células empleadas	Tejido	Método de aislamiento	Contraste de fase
PBMCs (Células mononucleares de la sangre, del inglés Peripheral Blood Mononuclear Cells)	Sangre periférica de donantes sanos	Aislamiento por gradiente de densidad por centrifugación en Ficoll	
SVFs (Células mesenquimales humanas, del inglés Stromal Vascular Fraction)	Liposucciones de donantes sanos	Digestión con colagenasa	
MEFs (Fibroblastos embrionarios de ratón, del inglés Mouse Embryonic Fibroblasts)	Embriones de ratón de 14.5 dpc	Comerciales de AppliedStemCells	

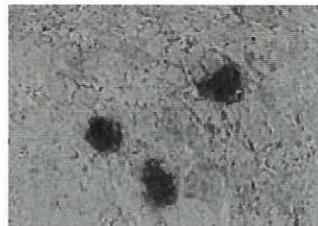
Tabla 1. Tipos celulares empleados, tejido de origen, método de aislamiento y microfotografía de contraste de fase de las células empleadas para establecer el método estándar de reprogramación celular.

3. **Caracterización celular de la reprogramación.** Se llevó a cabo por tres vías:

3.1. Evaluación morfológica: Las células reprogramadas se hacen más pequeñas, con mayor ratio núcleo/citoplasma y forman colonias compactas definidas por bordes claros como en la siguiente foto de un cultivo en contraste de fase:



3.2. Fosfatasa alcalina. La pluripotencia (establecimiento de la reprogramación) va asociada a la expresión de fosfatasa alcalina, que se revela con Fast red como se aprecia en la siguiente foto en rojo. Así las colonias positivas suelen ser pluripotentes y las colonias negativas revelan colonias semi-reprogramadas o diferenciadas.



3.3. Formación de cuerpos embrioides. Para comprobar funcionalmente que las colonias generadas son de hecho pluripotentes, éstas deben ser capaces de diferenciarse a células de las tres hojas embrionarias, por lo que se llevan a cabo ensayos de formación de cuerpos embrioides in vitro e inmunofluorescencia para marcadores de dichas hojas (endodermo con albúmina, mesodermo con vimentina y ectodermo con citoqueratinas).

4. Método de reprogramación (Culture timeline): El método empleado se detalla en la Figura 2.

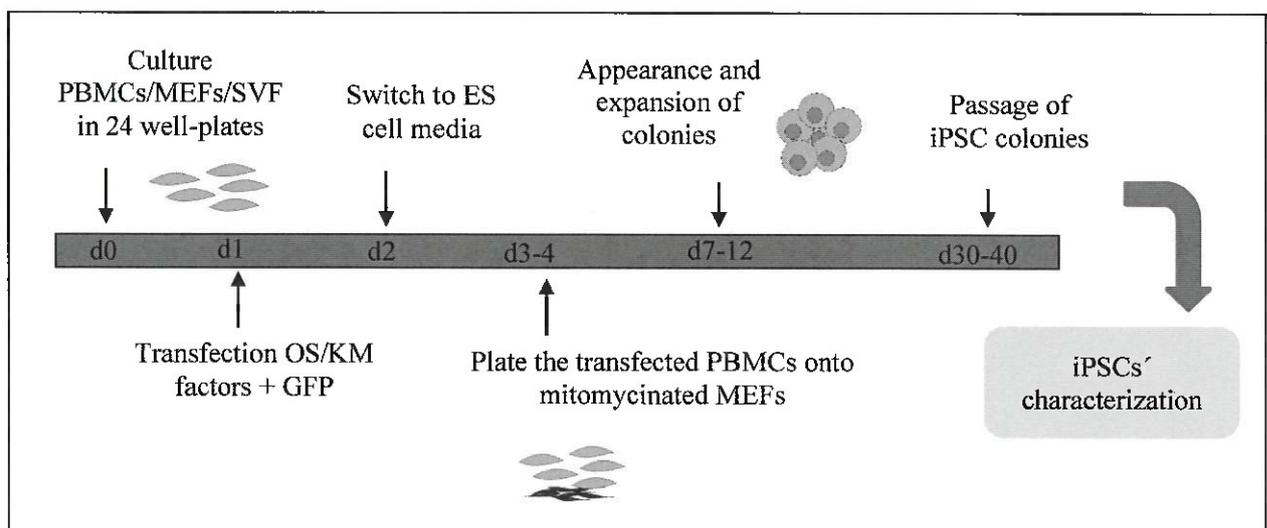


Figura 2. Gráfico detallado de los hitos de reprogramación en cultivo. Las células se transfectan el primer día de cultivo, se les cambia el medio a uno específico para células pluripotentes al día siguiente y a los 3 días se siembran sobre células nutricias (MEFs). Las colonias aparecen a los 7-12 días y al cabo de un mes han crecido lo suficiente para su caracterización.

La reprogramación de los tres tipos celulares se llevó a cabo en tres condiciones metabólicas: Normoxia (21% O₂), Hipoxia (3% O₂) el mismo día de la transfección (día 0 post-transfección) e hipoxia (3% O₂) a día 4 post-transfección. Estos dos últimos casos se eligieron para dilucidar si las condiciones hipóxicas influyen en la reprogramación sólo una vez que ésta se ha iniciado o bien son favorecedoras sólo si la hipoxia es previa a la reprogramación.

5. Resultados de la eficiencia de transfección. Se encontraron diferencias significativas respecto del tipo celular, siendo los MEFs las células con mayor eficiencia y los PBMCs las de menor, tal y como se esperaba (Figura 3).

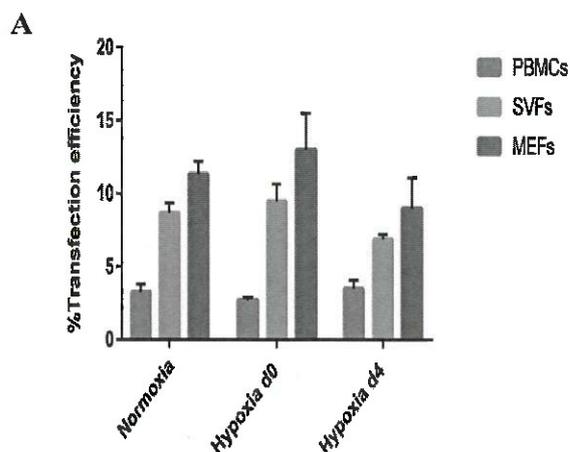


Figura 3. Eficiencia de transfección respecto al tipo celular. Se observa que la mayor eficiencia se consigue para los MEFs (barras verdes) y la menor para los PBMCs (barras azules), con una eficiencia intermedia para las células de la SVF (barras naranja).

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia de transfección respecto a las condiciones de concentración de oxígeno (Figura 4).

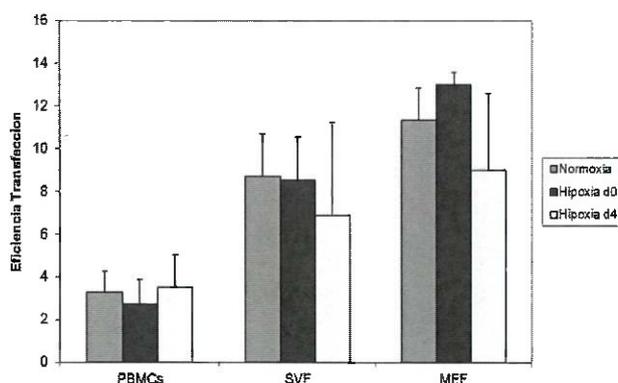


Figura 4. Eficiencia de transfección respecto a la concentración de oxígeno. Se observa que no hay diferencias dentro de cada tipo celular entre las condiciones de normoxia (barras azules) hipoxia desde el día de la transfección (barras granate) e hipoxia tras 4 días de la transfección (barras vainilla).

6. Resultados de la reprogramación celular: La reprogramación con vectores episomales fue posible para todos los tipos celulares empleados con una eficiencia muy elevada. La eficiencia media fue de $0,18\% \pm 0,04\%$ y la máxima de $0,48\% \pm 0,1\%$. En la Figura 5 se muestran ejemplos de colonias de células reprogramadas provenientes de los diferentes tipos celulares empleados.

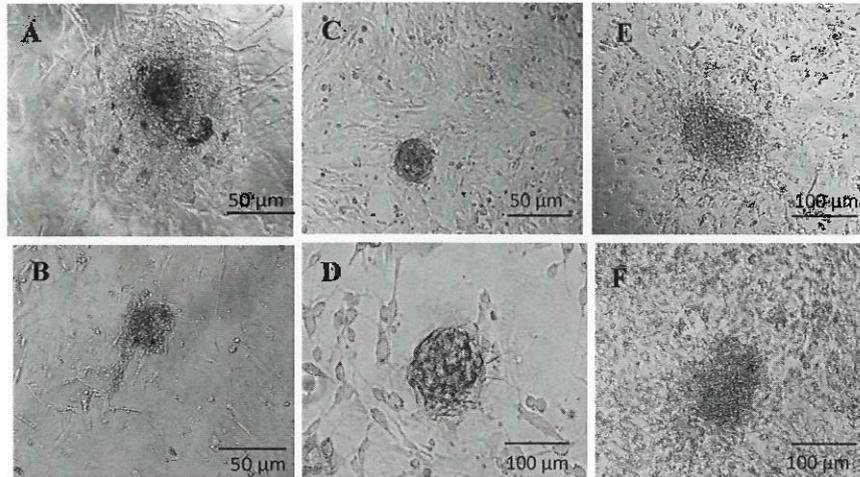


Figura 5. Microscopía de contraste de fase de colonias de células reprogramadas provenientes de PBMCs (A y B), SVF (C y D) y MEFs (E y F).

7. Resultados de la caracterización de las células reprogramadas generadas. Las colonias generadas son pluripotentes, ya que tienen el potencial de diferenciarse en tipos celulares de las tres hojas embrionarias in vitro tras la formación espontánea de cuerpos embrioides (Figura 6).

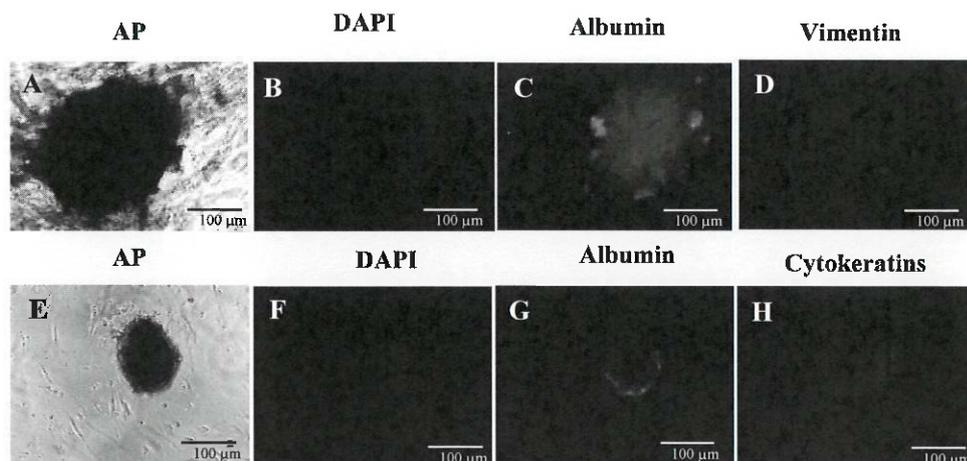


Figura 6. Formación de cuerpos embrioides in vitro y caracterización de las células reprogramadas por histoquímica para fosfatasa alcalina (AP) e inmunofluorescencia para marcadores de las tres hojas embrionarias. A-D: Células reprogramadas provenientes de MEFs, E-H: Células reprogramadas provenientes de PBMCs. Las colonias son negativas para fosfatasa alcalina por estar diferenciadas, y positivas para varias hojas embrionarias (albúmina para endodermo, vimentina para mesodermo y citoqueratinas para ectodermo). Se empleó DAPI para teñir todos los núcleos celulares.

8. Resultados de las condiciones metabólicas en la eficiencia de reprogramación. La hipoxia incrementa ligeramente la eficiencia de reprogramación en todos los tipos celulares (Figura 7).

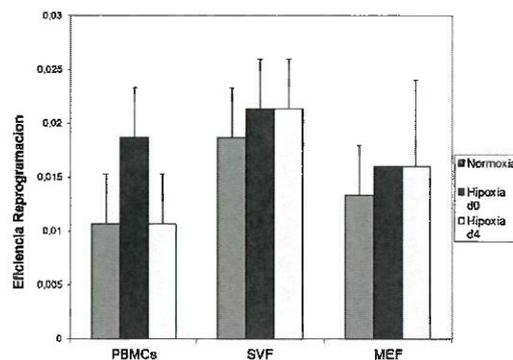


Figura 7. Efecto de las diferentes concentraciones de oxígeno en la reprogramación celular de los tres tipos celulares utilizados. Normoxia: barras violeta, hipoxia desde el primer día de la reprogramación: barras granate y desde el cuarto día: barras vainilla. No hay diferencias entre hipoxia en el día 4 respecto a día 0, excepto en las PBMCs donde la hipoxia es necesaria desde el principio para inducir un incremento en la reprogramación.

Sin embargo, al rehacer las gráficas respecto a la eficiencia de transfección, se observó que el efecto de la hipoxia se perdía en las células humanas, tanto los PBMCs como en las SVF (Figura 8):

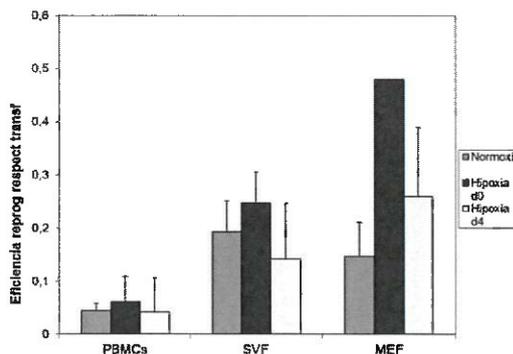


Figura 8. Eficiencia de reprogramación respecto a la eficiencia de transfección bajo las diferentes concentraciones de oxígeno en la reprogramación celular de los tres tipos celulares utilizados. Normoxia: barras violeta, hipoxia desde el primer día de la reprogramación: barras granate y desde el cuarto día: barras vainilla.

11. Resultados de la formación de focos oncogénicos. En primer lugar se procedió a establecer líneas de focos oncogénicos (OF) a partir de células sanguíneas (PBMCs) de donantes sanos. Para ello se derivaron OF por medio de nucleofección con los factores cMyc y Klf4 a la vez que se derivaron iPSC de las mismas células del mismo donante añadiendo además Oct4 y Sox2. Las colonias obtenidas eran en todos los casos fosfatasa alcalina positivas (Figura 9). No se encontraron diferencias morfológicas entre ambos tipos de colonias.

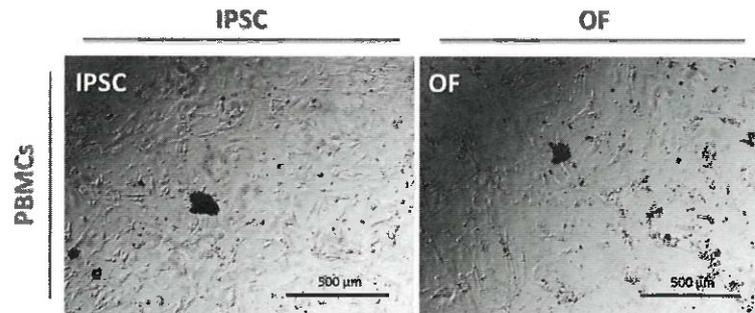


Figura 9. La pluripotencia va asociada a la expresión de fosfatasa alcalina, que se revela con Fast red como se aprecia en la siguiente foto en rojo. Se han generado con éxito tanto iPSC como OF de células sanguíneas del mismo donante.

Para comprobar que las líneas generadas de OF lo son, se procedió a cultivarlas en un medio de cultivo sin contacto (Methocult), una característica exclusiva de las células transformadas (Figura 10A). Además se comprobó que eran positivas para el receptor del factor inhibidor de la leucemia, comprobando así de forma efectiva su identidad como células transformadas oncogénicas (Figura 10B-2D).

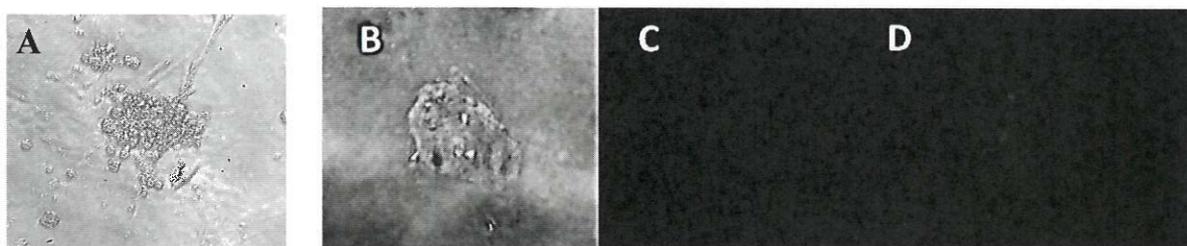


Figura 10. A: Microscopía de contraste de fase de Foco oncogénico creciendo sin anclaje en Methocult. B-D: Inmunohistoquímica para LIFR (D, en rojo) de foco oncogénico (C: núcleos en azul con DAPI) y B: OF en contraste de fase. Aumentos: 400x.

12. Comparativa entre reprogramación y transformación oncogénica. A continuación se procedió a la comparativa de la eficiencia de la reprogramación y la transformación oncogénica en PBMC. No hay diferencias significativas en la eficiencia de los dos procesos (Figura 11). Puede verse una tendencia a la desaparición de algunas colonias con el paso del tiempo. La ausencia de diferencias significativas entre las eficiencias de los procesos podría ayudar en las comparaciones entre pacientes y donantes sanos.

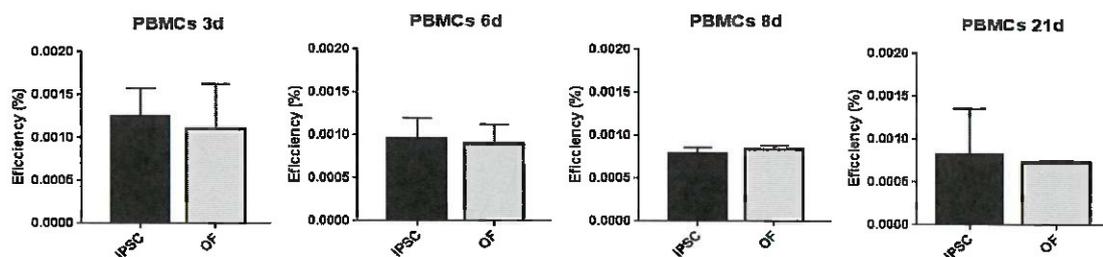


Figura 11. Comparativa de la eficiencia de reprogramación (iPSC) frente a la de transformación (OF) de células sanguíneas (PBMCs) de donantes sanos a los 3, 6, 8 y 21 días de la nucleofección. No hay diferencias significativas, Los datos se muestran en porcentaje respecto a la eficiencia de nucleofección. Datos de n= 2 donantes x 2 réplicas técnicas.

13. Comparativa de la cinética de la reprogramación respecto a las condiciones metabólicas. Respecto de la comparativa de la eficiencia de la reprogramación en normoxia e hipoxia en PBMCs (Figura 12), las eficiencias de reprogramación de las iPSCs obtenidas a partir de PBMCs se encuentran entre 0,07-0,1%. No existen diferencias significativas entre normoxia e hipoxia en las eficiencias de reprogramación de las iPSCs obtenidas a partir de PBMCs en los diferentes días. Existe una diferencia significativa en la eficiencia de reprogramación en hipoxia entre los días 3 y 8, $p \leq 0.05$.

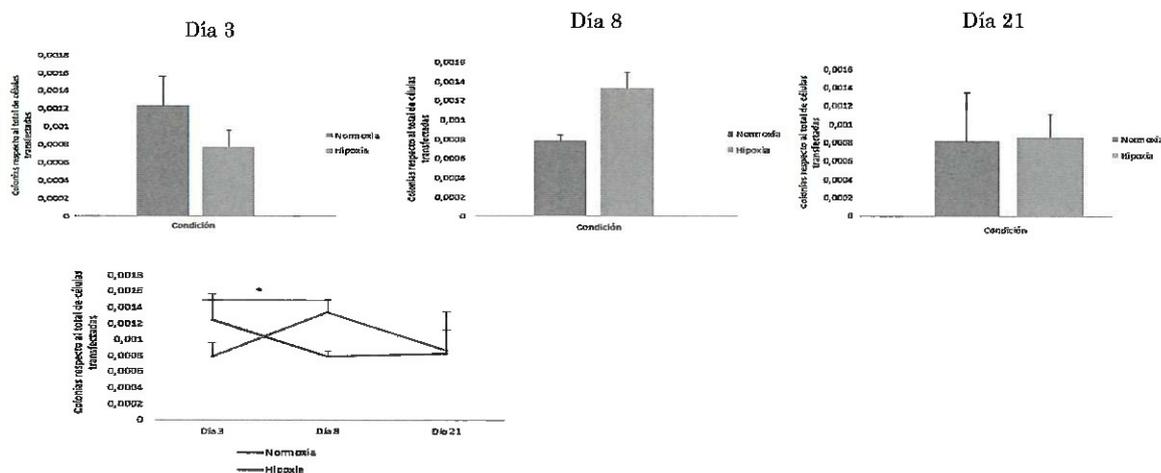


Figura 12. Comparativa de la formación de iPSC en normoxia (barras azules) versus hipoxia (barras marrones) en los diferentes días desde PBMCs de donantes sanos. Datos de n= 2 donantes x 2 réplicas técnicas.

14. Resultados de reprogramación en subtipos celulares dentro de la sangre periférica. Pensamos que esta pérdida de la significación en PBMCs podría deberse a la presencia de diversos tipos celulares que pueden responder a la hipoxia de forma distinta. Ya que el porcentaje de linfocitos es de aproximadamente de un 80% en sangre periférica, probablemente estos datos reflejan la falta de influencia de la hipoxia en los linfocitos. De hecho se ha descrito que son los monocitos los más susceptibles a cambios metabólicos inducidos por las condiciones ambientales. Por ese motivo aislamos los dos subtipos principales de los PBMCs, linfocitos y monocitos (Figura 13), y volvimos a reprogramarlos por separado.

MONOCYTE ISOLATION FROM PATIENT 15 PBMCs (male 52 y.o.)

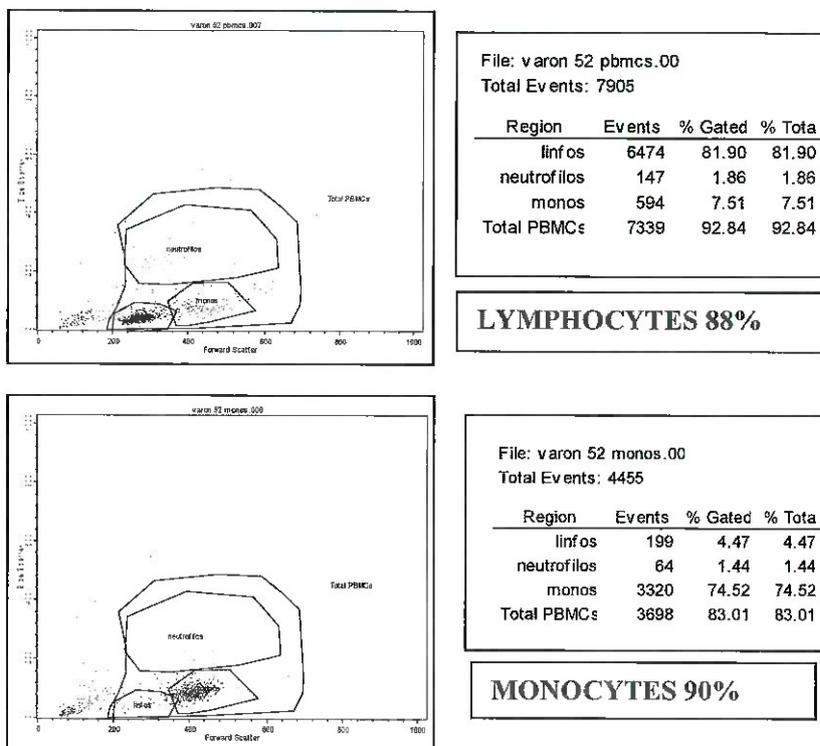


Figura 13. Aislamiento de linfocitos y monocitos de la sangre de un donante sano, se observa un enriquecimiento de un 90% en la población monocitaria.

15. Resultados de la generación de células reprogramadas a partir de linfocitos y monocitos de sangre periférica. Ambas subpoblaciones se consiguieron reprogramar y transformar (Figura 14). Las colonias tienen aspectos similares independientemente de su procedencia.

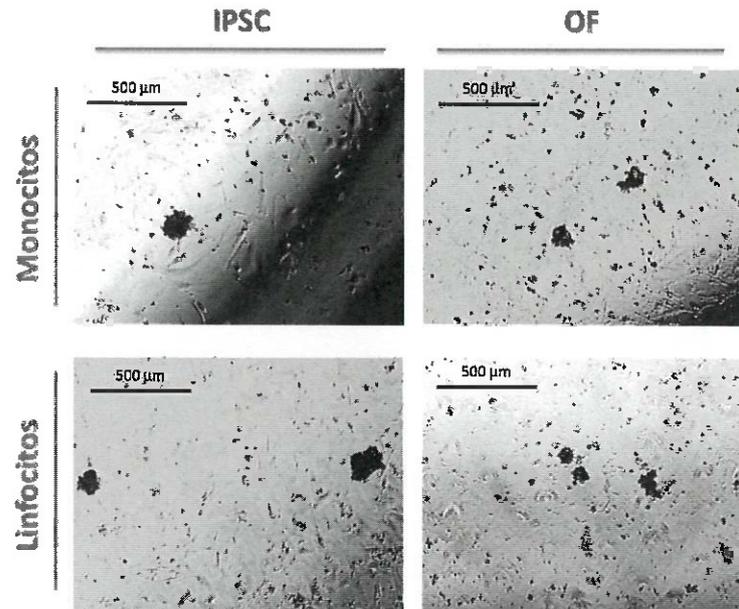


Figura 14. Histoquímica para fosfatasa alcalina (en rojo) de colonias reprogramadas y transformadas. Se han generado con éxito tanto iPSC como OF de monocitos y linfocitos del mismo donante.

Como en el caso de los PBMCs, se calculó la eficiencia de la transfección en las subpoblaciones de células sanguíneas como el número de células GFP positivas respecto del número de células sembradas partido por 100 (Figura 15):

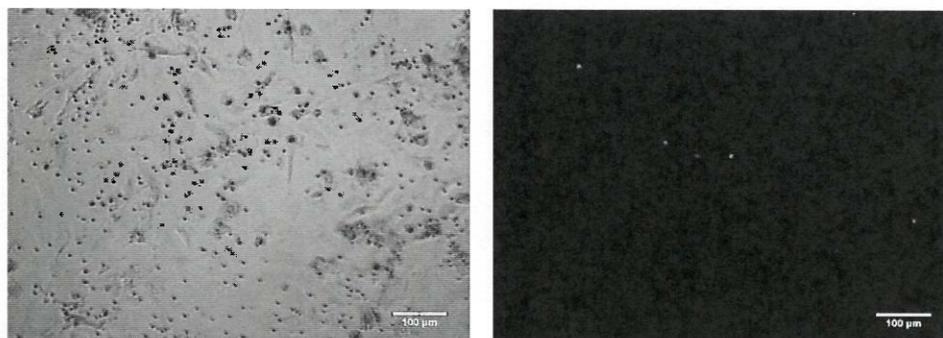


Figura 15: Microscopía de contraste de fase (izquierda) y de fluorescencia (derecha) mostrando linfocitos efectivamente nucleofectados.

La eficiencia de transfección para las diferentes subpoblaciones fue de: Linfocitos 7%±4% n= 22 donantes; Monocitos 12% ±8% n=27 donantes.

16. Cinética de la reprogramación en las diferentes subpoblaciones sanguíneas. Se demostró que en Linfocitos: Diferencia significativa $p \leq 0.05$ en las eficiencias de reprogramación en hipoxia entre el día 6 y 8, mientras que en Monocitos: Diferencia significativa en $p \leq 0.05$ las eficiencias de reprogramación en hipoxia entre el día 6 y 15 (Figura 16):

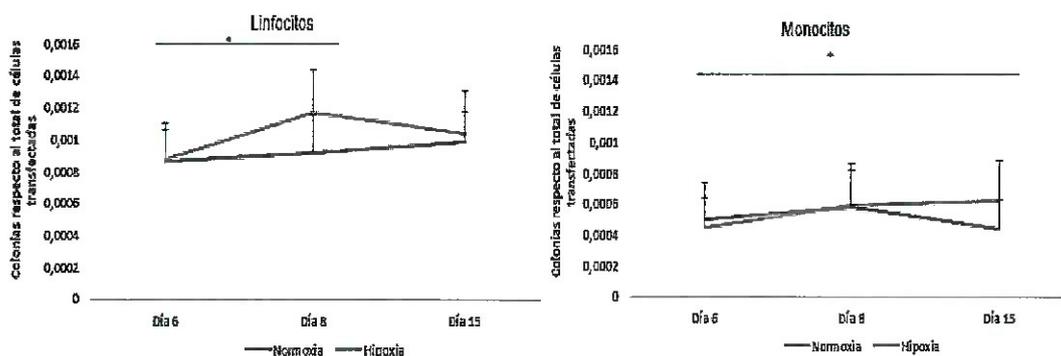


Figura 16: Cinética de la reprogramación de linfocitos y monocitos en condiciones de normoxia (línea azul) e hipoxia (línea marrón). Asterisco: Diferencia estadísticamente significativa t de Student en $p \leq 0.05$.

17. Eficiencia de la reprogramación en las diferentes subpoblaciones sanguíneas: La eficiencia de reprogramación de los linfocitos es mayor (0,08-0,1%) que la eficiencia de reprogramación de los monocitos (0,05%) en los distintos días con diferencia significativa $p \leq 0.05$ (Figura 17). De forma muy importante, y demostrando que los datos obtenidos con la mezcla de PBMCs enmascaraban los resultados, se comprobó que existe una diferencia significativa entre normoxia e hipoxia en las eficiencias de reprogramación en los monocitos a los 15 días $p \leq 0.05$.

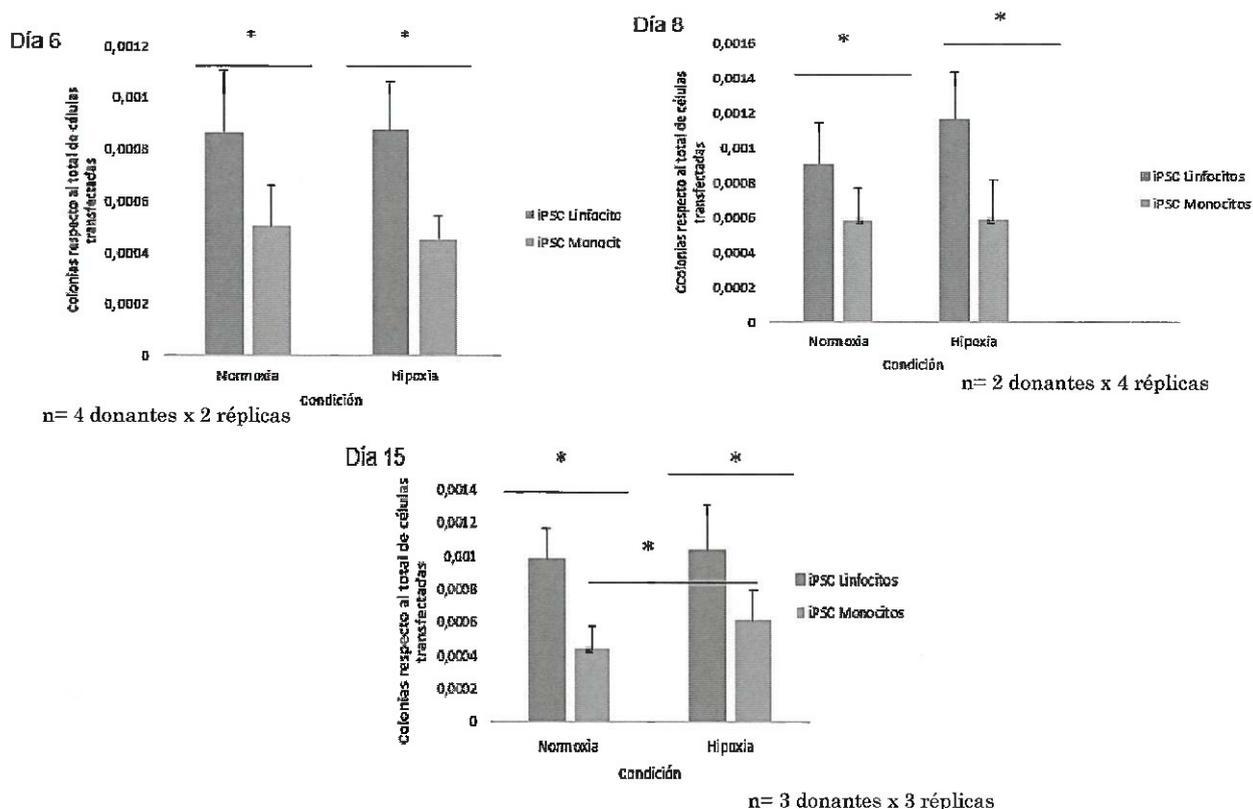


Figura 17. Comparativa entre las eficiencias de reprogramación de linfocitos (barras azules) y monocitos (barras marrones) en los diferentes días tras la nucleofección (días 6, 8 y 15) y en condiciones de normoxia e hipoxia. Asterisco: Diferencia estadísticamente significativa t de Student en $p \leq 0.05$.

18. Eficiencia de la transformación oncogénica en las diferentes subpoblaciones sanguíneas: Respecto de la transformación oncogénica, los linfocitos presentan mayor facilidad para la reprogramación pero no para la transformación (Figura 18). No hay diferencias en la eficiencia de transformación oncogénica con el tiempo.

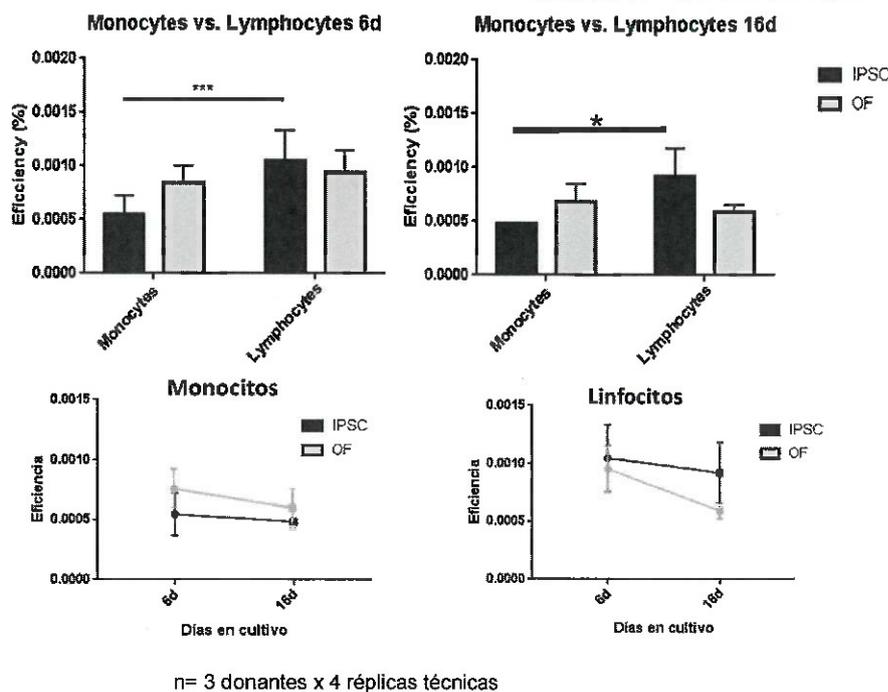


Figura 18. Comparativa de la eficiencia de la transformación oncogénica (barras azul claro) en subpoblaciones sanguíneas (monocitos y linfocitos) de donantes sanos, No hay diferencias estadísticamente significativas.

Además se ha trabajado en el establecimiento de un método de derivación de las líneas que no conlleve el uso de células nutricias, de forma que se facilite su aislamiento por los estudios posteriores de RNA-seq y que por tanto no interfiera o enmascare posibles resultados moleculares. Este método se basa en el cultivo sobre una matriz extracelular de Matrigel. De hecho, Los PBMCs se han conseguido reprogramar hacia iPSCs en ausencia de células nutricias con morfologías similares (Figura 19):

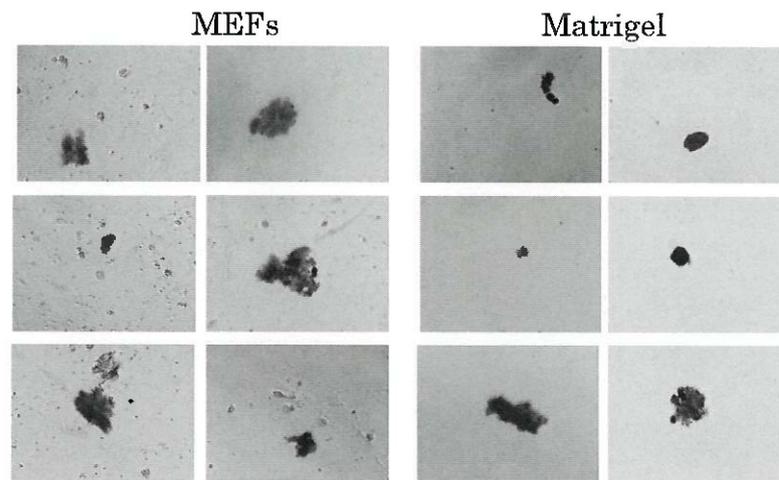


Figura 19. Histoquímica para fosfatasa alcalina de colonias iPSC originadas de PBMCs de un mismo donante en presencia (MEF) o ausencia (Matrigel) de células nutricias.

La eficiencia de generación de esas líneas reprogramadas fue similar en presencia o ausencia de células nutricias (Figura 20):

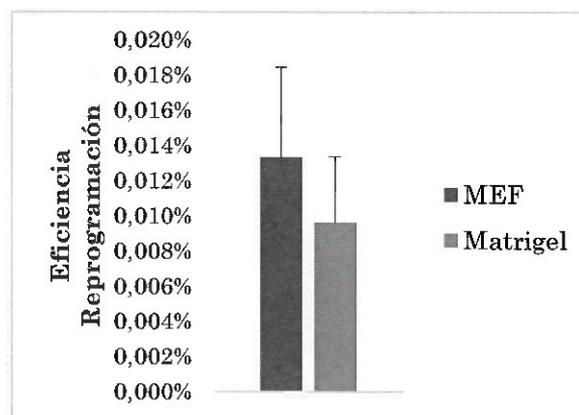


Figura 20. Eficiencia de reprogramación mostrada como colonias/células transfectadas en presencia (MEF) o ausencia (Matrigel) de células nutricias. n= 1 donante x 4 réplicas técnicas. p=0,39 no significativo.

19. Derivación de células reprogramadas y focos oncogénicos de pacientes con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC). Se han generado iPSC y OF tanto de linfocitos como de monocitos (Figura 21):

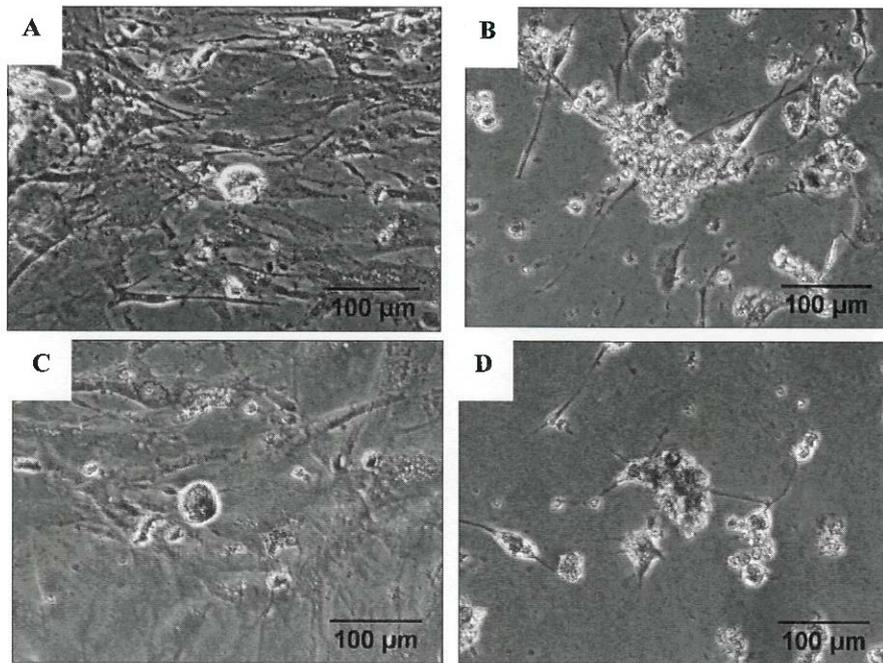


Figura 21. (A) Microscopía óptica de contraste de fase de OFs provenientes de linfocitos. (B) iPSCs provenientes de linfocitos. (C) OFs provenientes de monocitos. (D) iPSCs provenientes de monocitos, todos de pacientes con EPOC.

20. Eficiencia de la reprogramación y la transformación oncogénica en pacientes EPOC respecto de donantes sanos.

Estas comparaciones se realizaron en condiciones de normoxia exclusivamente y a los 14 días del cultivo.

20.1. Primero se realizó con los linfocitos, comprobándose que existen diferencias significativas en la reprogramación celular, siendo más alta en los pacientes con EPOC (Figura 22A). Aunque la tendencia es similar, no existen sin embargo diferencias estadísticamente significativas en el caso de la transformación oncogénica (Figura 22B):

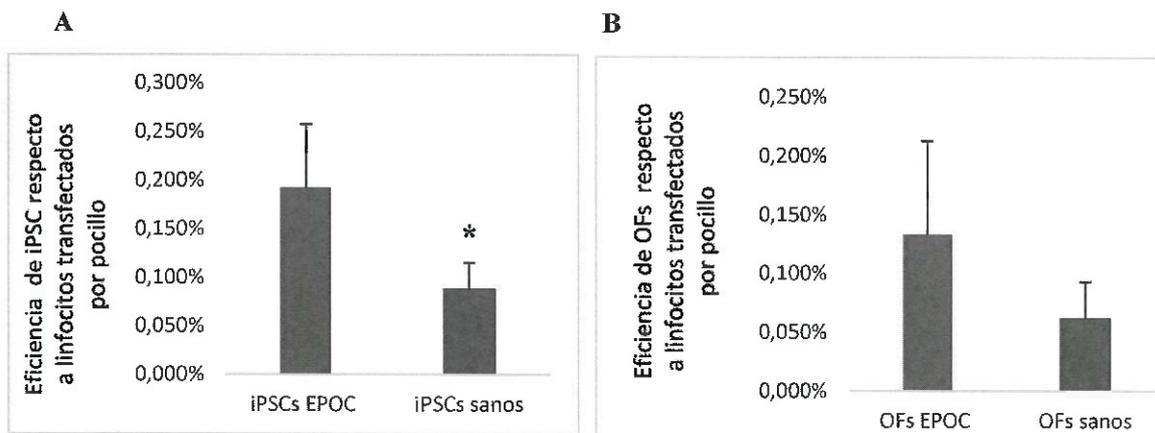


Figura 22. Comparativa de la eficiencia de la reprogramación celular (A) y la transformación oncogénica (B) en linfocitos de pacientes con EPOC respecto a sanos. Asterisco: Diferencia estadísticamente significativa t de Student en $p \leq 0.05$.

20.2. A continuación se realizó la **comparativa de la eficiencia de la reprogramación celular y la transformación oncogénica utilizando la subpoblación sanguínea de los monocitos**. Al contrario que para los linfocitos, aunque la tendencia era de mayor eficiencia en los EPOC para ambos procesos, sólo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el caso de la transformación oncogénica (Figura 23):

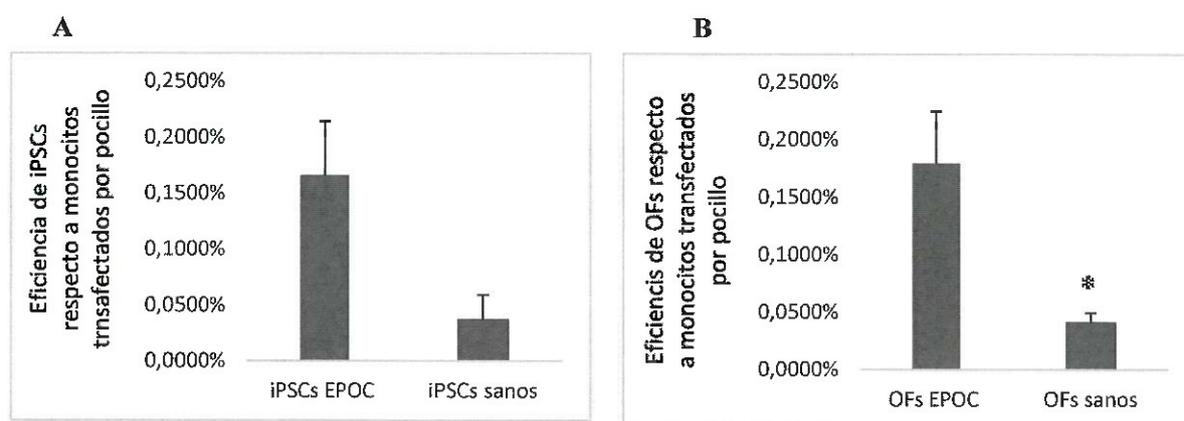


Figura 23. Comparativa de la eficiencia de la reprogramación celular (A) y la transformación oncogénica (B) en monocitos de pacientes con EPOC respecto a sanos. Asterisco: Diferencia estadísticamente significativa t de Student en $p \leq 0.05$.

21. Resultados curriculares

- Un contrato:

- Adrián Moratilla Riofrío

- Dos Trabajos Fin de Máster:

- Andrea Santos Cáceres, Contribution of metabolic modification to cellular reprogramming. UAM, Julio 2017, Calificación: Sobresaliente
- Alba Cabrera Fisac, Comparación de la reprogramación celular y la transformación oncogénica in vitro en diferentes subpoblaciones de leucocitos. UAM, Julio 2018, Calificación: Sobresaliente

- Un Trabajo Fin de Grado:

Pilar González Molina. Comparativa de las condiciones metabólicas en la reprogramación celular de diferentes subpoblaciones de células sanguíneas. UAH, Julio 2018, Calificación: Sobresaliente

- **Una Publicación:** De Miguel MP, Moratilla A, Cabrera-Fisac A, González-Molina P. Toward Induced Pluripotent Stem Cells for Clinical Use: Sources, Methods and Selection. *Frontiers in Stem Cell and Regenerative Medicine Research*, 2019, 1-33. Agradecimientos a la FDM.

FDM-Ayudas 2017

- **Resultados preliminares que han permitido pedir un Proyecto al MICINNUV:** Contribución de la modificación metabólica a la reprogramación celular y la transformación oncogénica (HIPONREP).

Resultados pendientes

- **Un Trabajo Fin de Grado:** Míriam Santos Medina. Reprogramación celular en pacientes con EPOC. UAH (previsto presentación Junio 2019)
- **Una publicación:** Cell reprogramming in COPD patients. (en preparación)