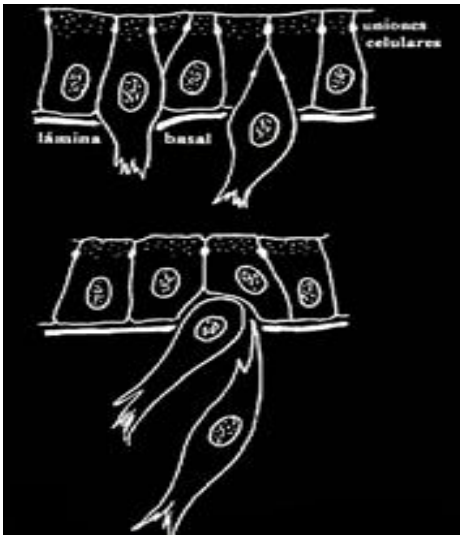
UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE OBSTETRICIA

# Transición

# Epitelio-mesénquima y Reprogramación celular




**Curso:** Bases celulares genéticas y del desarrollo ontogénico humano

**Unidad III:** Biología del desarrollo

**Profesor tutor:** Leonel Muñoz

**Integrantes:**

- Daniela Vieytes
- Valentina Vilches
- Catalina Vivanco

**Fecha de entrega:** 29/Junio /2012

## Introducción

El desarrollo embrionario es un período que va desde la fecundación del ovocito hasta el nacimiento de un nuevo ser. Luego de la fecundación, ocurre el proceso de segmentación, que consiste en repetidas divisiones celulares y, posteriormente, las células originadas se diferencian, dándose paso a la morfogénesis, suceso que dará origen a los futuros órganos del embrión. Durante esta fase ocurren varias divisiones y migraciones celulares, lo que determina la formación de tres capas germinativas: ectodermo, mesodermo y endodermo[1]. La formación del tejido epitelial es el punto de inicio de la morfogénesis. El primer tejido epitelial que se forma en el embrión temprano, es el trofoectodermo (células del trofoblasto compactadas), que es la capa más externa del blastocisto (envolviendo a la masa interna o embrioblasto) que dará origen a la placenta[2].

Previo a la formación del mesodermo y endodermo, ocurre la gastrulación. Al comienzo de la gastrulación, la masa celular interna del blastocisto está formado por dos capas: epiblasto e hipoblasto. El primer evento de la gastrulación es la formación del nodo y del surco primitivo. El surco primitivo se origina debido a que las células epiblásticas se desplazan hacia el interior (se invaginan)[3]. Durante este proceso, las células epiteliales del epiblasto atraviesan una serie de transformaciones morfológicas cambiando su estructura y características. Esta transformación celular se denomina **Transición Epitelio-Mesénquima** y participa en el origen de la capa intermedia (mesodermo) y profunda (endodermo definitivo). Las primeras células del epiblasto que invaginan forman el endodermo definitivo y las posteriores, el mesodermo. Este proceso, y todos los que ocurren gracias a una TEM, requieren de ciertos estímulos inductores para que se den a cabo y, además, tienen algunas características particulares, las cuales mencionaremos en este informe.

## Transición epitelio-mesénquima

El tejido epitelial se caracteriza por ser compacto, de forma hexagonal, con escaso espacio entre sus células y sin capacidad migratoria individual, un tejido en donde las células se encuentran unidas por complejos de unión intercelulares, donde encontramos las uniones de tipo adherente, las cuales son posibles gracias a una proteína integral de membrana llamada E-cadherina. La E-cadherina es una

proteína transmembrana, dependiente de Calcio, cuya fracción extracelular se entrelaza con las moléculas de E-cadherina de las células vecinas, y su porción intracelular se une al citoesqueleto a través de las proteínas intracelulares llamadas cateninas, siendo la β-catenina la responsable de la unión con la actina del citoesqueleto[4] (Figura 1). El epitelio se caracteriza, además, por presentar una polaridad ápico-basal, en donde la región apical se especializa básicamente en cilios y la región baso-lateral en interacciones con la matriz extracelular formando la lamina basal. Por el contrario, las células mesenquimaticas son de forma estrellada y poco compacta, por lo que pueden migrar de forma individual, presentando una fuerte interacción con la matriz extracelular.

La TEM, juega un rol central en la embriogénesis. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario temprano, el mesodermo, generado por TEM, se desarrolla en muchos otros tipos de tejidos, y, posteriormente, las células mesodérmicas generan órganos epiteliales, como el riñón y los ovarios mediante una Transición Mesénquima-Epitelio (TME)[5].

Para que ocurra una TEM, la célula debe perder las características epiteliales y adquirir características de una célula mesenquimática (Figura 2). Esta transición es inducida por medio de una conjugación de moléculas inductoras, ya sea por el factor de crecimiento transformante β (TGF-β) o factores de transcripción como Snail, Slug, Twist 1, Zeb1, Hif-1alfa, entre otros, los que provocan un cambio en la expresión de genes, particularmente la inhibición de la expresión de E-cadherina (Figura 3). Posterior a esto, en la célula epitelial debe ocurrir un rompimiento de la lámina basal la que puede estar mediada por enzimas que las células subyacentes producen, como metaloproteinasas de la matriz (MMPs)). Luego, el citoesqueleto sufre una serie de cambios que promueven una constricción apical en la célula, ésta pierde su polaridad, adquiere forma de botella y se desprende del tejido epitelial al perder las uniones intercelulares con sus células vecinas (delaminación del epitelio), adquiriendo luego un comportamiento migratorio, y completando de esta forma el proceso de conversión en células mesenquimáticas. Una TEM está siempre asociada con el concepto de dispersión celular, generada por la pérdida de las uniones intercelulares y la

adquisición de movilidad celular. Luego de un experimento con células de carcinoma de vejiga de rata se concluye que la dispersión celular consiste en al menos dos eventos biológicos:

- Disociación célula – célula: resultado del rompimiento de los complejos intercelulares.
- Movimiento celular, impulsado por reordenamientos del citoesqueleto y la formación de nuevos contactos entre célula – sustrato.

La dispersión celular no se presenta como un proceso celular autónomo, ya que requiere de estimulación externa para ser activado[6]. Investigaciones sobre la genética del desarrollo han revelado un número de factores transcripcionales que juegan un papel crítico en la embriogénesis y que orquestan las TEM.

El primer paso en la TEM, es su activación por un efector inductivo que permita un cambio en la regulación génica, reprimiendo la expresión de E-cadherina. El modo primario de inducción de la TEM es provisto por factores de crecimiento específicos o receptores afines a componentes de la matriz extracelular. Uno de estos factores de crecimiento es, por ejemplo, el TGF-β. El factor de crecimiento transformante β (TGF- β) es una familia de proteínas que incluye al TGF-β, activinas y a la proteína morfogénica de hueso (BMP). La activación del receptor del TGF-β propicia su fosforilación en residuos de serina/treonina y dispara la fosforilación de proteínas efectoras intracelulares (SMAD)[7], que una vez activas se translocan al núcleo para inducir la transcripción de genes que codifican para el factor de transcripción SIP1 y Snail que se unen al promotor del gen de E- Cadherina y lo reprimen, lo que lleva a la acumulación de la β – catenina en el citoplasma; la cual ingresa al núcleo, donde puede entonces activar y estabilizar la expresión de los factores de transcripción que inducen a la TEM[8].

Se ha demostrado además que la Ras-MAPK activa dos factores de transcripción conocidos como Snail y Slug. Ras pertenece a una familia de proteínas G pequeñas con propiedad de GTPasas. Este grupo de enzimas, que comprende además GTPasas de la familia Rho (involucradas en los procesos de señalización a través de receptores de factores de crecimiento), se caracteriza por activar serina/treonina quinasas de la familia MAPK e interaccionar entre ellas en una "conversación"

cruzada. Se pueden acoplar a múltiples efectores cuesta abajo en la cascada de señalización y ser responsables de múltiples salidas funcionales en la célula[9]. Snail y Slug activadas por esta vía, son represores transcripcionales de E-cadherina, y su expresión induce la TEM. Twist, otro factor de transcripción y la expresión de FOXC2, un factor importante durante el desarrollo embrionario, inducen también la TEM y regulan, además, la metástasis. Por otra parte, la expresión de FOXC2 se induce cuando las células epiteliales se someten a la TEM mediante los factores de transcripción Snail y Twist, y mediante los ligandos Goosecoid y TGF-β 1(Figura 4).

## Transición epitelio-mesénquima en procesos patológicos y reprogramación celular

A lo largo de numerosas investigaciones genéticas se ha revelado que los factores de transcripción que dirigen la TEM también regulan la metástasis, otorgando invasividad y resistencia a la apoptosis en células cancerígenas, debido a que la TEM es un rasgo característico de las células en proliferación. El inicio de la metástasis tiene muchas similitudes fenotípicas con la TEM, incluyendo la pérdida de la adhesión célula-célula, mediada por la represión de E-cadherina y un aumento de la movilidad celular[10]. Por otro lado, se han descrito ampliamente las células madres en un tejido normal, las cuales son capaces de autorenovarse por divisiones asimétricas, donde sus descendientes, pueden diferenciarse regenerando el tejido al que pertenecen o seguir siendo células madres. Más recientemente, estudios en tejidos neoplásicos, han entregado la evidencia de que sólo un pequeño grupo de células (0,01% de las células cancerosas) de estos poseen la capacidad de formar nuevos tumores, lo cual implica tener capacidad de autorenovación y pluripotencialidad de diferenciación. A este grupo de células tumorales se les llamó Células Madres Cancerígenas (*CSC*).

Razonando que el proceso de metástasis de los carcinomas (Cánceres de Tejidos Epiteliales) implican la formación de un nuevo tumor, con toda su complejidad biológica, a partir de una sola célula (CSC) que debe atravesar una TEM al viajar entre el tumor primario y el lugar donde desarrolla la metástasis, y pensando en lo frecuente que es la ocurrencia de metástasis en los cánceres y lo escasas que son las CSC dentro de un tumor, un grupo de investigadores se planteó una posible relación entre la TEM y la adquisición de capacidades de células madres.

Para determinar si las células madres adultas y las células que han experimentado una TEM tienen rasgos similares, se indujo una TEM en células epiteliales mamarias inmortalizadas neoplásicas y no neoplasicas, mediante expresiones ectópicas de factores de transcripción, ya sea TWIST o SNAIL, ambos capaces de inducir una TEM, en células epiteliales obteniéndose células con rasgos de células mesénquimaticas, que habían disminuido la expresión de ARNm codificantes para marcadores epiteliales (como la E-cadherina), aumentando la expresión de ARNm codificantes para marcadores mesenquimales (cómo la N-cadherina, vimentina y fibronectina). Además, la mayoría de las células de tipo mesenquimáticas generadas por TEM manifestaron la expresión de marcadores de célula madre, adquiriendo también la capacidad de formar mamósferas (cúmulo esférico de células), una propiedad asociada a las células madres del epitelio mamario.

Con estos hallazgos en mente, se examinó la habilidad que tenían las células epiteliales con TEM inducida para formar mamósferas, en comparación con células que no atravesaron por este proceso; y se encontró que las células en las que se provocó la expresión ectópica de los factores de transcripción Snail o Twist tenían una capacidad 30 veces mayor de formar mamósferas que las células a las que se le agregó ectópicamente un vector vacío. De una forma similar, también se indujo una TEM mediante una señal extracelular, agregando TGFβ-1 al medio de cultivo de las células (no transfectadas) y estas tuvieron la capacidad de formar 40 veces más mamósferas que células control no tratadas (Figura 5).

Para establecer si es necesario mantener el estímulo inductor de TEM para que una célula mantenga sus características de célula madre, se generó un sistema de expresión condicional de los factores de transcripción inductores de TEM en el mismo modelo celular. En este sistema la expresión de estos factores de transcripción sólo ocurre ante la presencia de Tamoxifeno (4-OHT) al unirse a un receptor de estrógeno introducido en el promotor de estos genes transfectados. Las células tratadas con Tamoxífeno, progresivamente desarrollaron un fenotipo con el marcador CD44 alto/CD24 bajo (se sabe que una conformación antigénica alta de CD44 y baja CD24, son propias de una célula madre mamaria) y gradualmente adquirieron la habilidad de formar un número incrementado de

mamósferas (Figura 6 y 7). Esta capacidad se mantuvo, una vez retirado el estímulo con Tamoxífeno. Con esto se comprobó que efectivamente, las células que ya habían atravesado por una TEM, mantuvieron las características de célula madre, sin necesidad de mantenerlas en la TEM.[11]

La presencia de rasgos de célula madre en células que han atravesado una TEM, da pie a especular que atravesaron además un proceso de reprogramación celular. Este proceso consta de una readquisición de la potencialidad de diferenciación en distintos linajes por parte de una célula diferenciada. En otras palabras, mediante la reprogramación celular se puede borrar la "memoria" del desarrollo de una célula, con lo que una vez devuelta a su estado embrionario, la célula puede ser convertida en un tipo totalmente diferente de célula.

## Conclusión

En síntesis, podemos decir que la TEM es un proceso fundamental en el desarrollo embrionario y también a lo largo de toda nuestra vida porque participa en el mantenimiento de los diferentes tejidos. Pero también debemos mencionar que se encuentra estrechamente relacionada con la formación de metástasis en el cáncer, ya que la inducción de una TEM en células epiteliales se produce por la adquisición de ciertos rasgos de célula mesenquimática y por la expresión de marcadores de células madres, lo que se relaciona directamente con la reprogramación celular, por lo mismo es que su estudio y conocimiento, cobra gran importancia clínica para el estudio de nuevos hallazgos y terapias contra el cáncer. Si bien, este no es un tema con el cual trataremos a diario en nuestro futuro laboral, lo debemos manejar como futuras matronas, ya que la TEM es determinante en el desarrollo embrionario, por lo que debemos abordarla como un conocimiento básico de nuestra área, enfocado en nuestra formación científica, más que en nuestra formación práctica.

# Bibliografía


1. Profesor en línea “Fecundación y desarrollo embrionario”. Disponible en http://www.profesorenlinea.cl/Ciencias/fecundaydesarrollofetohumano.htm
2. Rojas, Mariana. (2004) “Unidad de Embriología Humana para la Carrera de Medicina”. Material de Clase, pp. 5 y 6. Disponible en http://docencia.med.uchile.cl/embriologia/
3. Sadler, T.W. (2001) Langman, Embriología médica con orientación clínica, 8° edición, página 77
4. Bordón Rodríguez, Elisa; Fontes Neto, Fausto y cols. (2007) “Estudios Predictivos y Moleculares de Invasión y Metástasis”, Biocancer Research Journal, 4. Disponible en: http://www.biocancer.com/journal/303/2-proteinas-de-adhesion-celula-celula
5. Sendurai A. Mani, Wenjun Guo, Mai-Jing Liao y cols. (2008) “The Epithelial - Mesenchymal transition generates cells with properties of Stem Cells”, Cell 133, 704 – 708
6. Boyer, Brigitte; Vallés, Ana María y Edme, Natacha. (2000) "Induction and Regulation of Epithelial - Mesenchymal Transition", Biochemical Pharmacology, 60, pp 1091 - 1099.
7. (Gálvez Gastelum, Francisco Javier; Sandoval Rodríguez, Ana Soledad y Armendariz Borunda, Juan. (2004) “El factor de crecimiento transformante beta como blanco terapéutico”. Salud pública Méx 4, 46 pp. 341-350. Disponible en: http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342004000400009&lng=en&nrm=iso
8. Polyak, Kornelia; Weinberg, Robert A. (2009) “Transition between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits”, Natural Reviews; Cancer: Focus on Migration and Metastasis, pp.3.
9. Vitae, Academia Biomédica Digital, “La ruta Ras/Raf/MAPK en la señalización del linfocito T”. Disponible en: http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeCinco/Articulos/Reumatologia/la%20ruta%20ras.htm
10. “Tejido epitelial. ¿Qué es la transición epitelial-mesenquimal (EMT)?” Disponible en: http://www.epitelial.com/content/1/6/es/%BFque-es-la-transici%F3n-epitelial_mesenquimal-emt.html
11. Sendurai A. Mani, Wenjun Guo, Mai-Jing Liao y cols. (2008) “The Epithelial - Mesenchymal transition generates cells with properties of Stem Cells”.
12. Concha, Miguel. (2004) “Gastrulación”, Material de Clase Unidad de Embriología, pp 1 y 2. Disponible en http://docencia.med.uchile.cl/embriologia/
13. Concha, Miguel. (2012), Mecanismos celulares y supracelulares que dan forma al embrión, PPT página 11

## ANEXOS

**Figura 1:** Esquema que representa las uniones de tipo adherente que se hallan en el tejido epitelial, cuya principal función es de anclaje, estas uniones son posibles gracias a una proteína integral de membrana llamada E-cadherina.

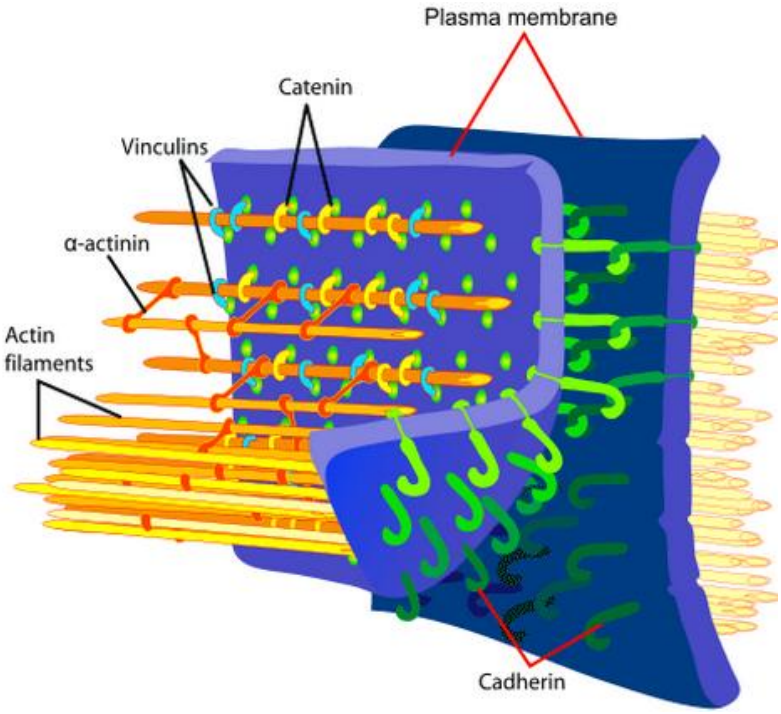



**Figura 2:** Representación de la Transición Epitelio – Mesénquima: Caracterización de las transformaciones morfológicas de las células epiteliales a células mesenquimáticas.

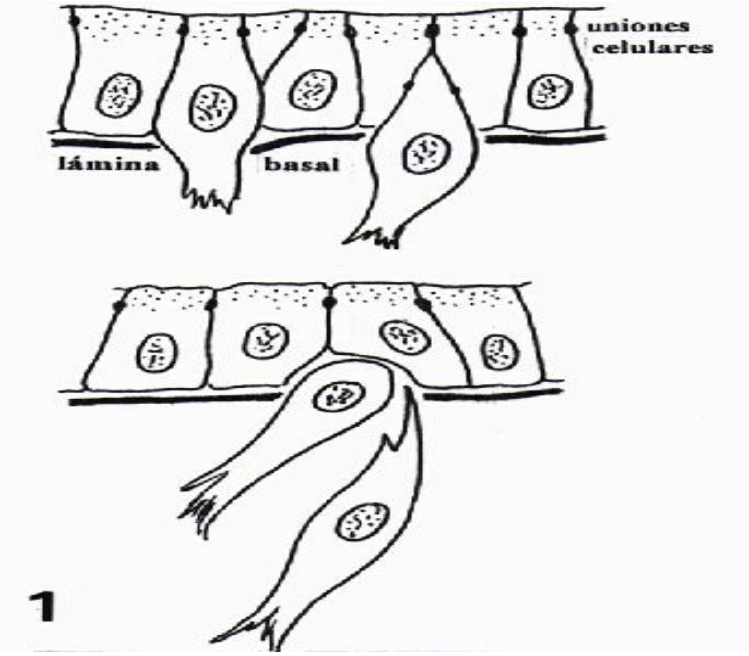


**Figura 3:** Esquema que muestra la inhibición de E-cadherina por medio de factores de transcripción (Snail y Twist) y por medio del factor de crecimiento TGF- β que activa a SMAD una proteína efectora intracelular, que induce la transcripción de genes que codifican para el factor de transcripción SIP1 y Snail que se unen al promotor del gen de E- Cadherina y lo reprimen.

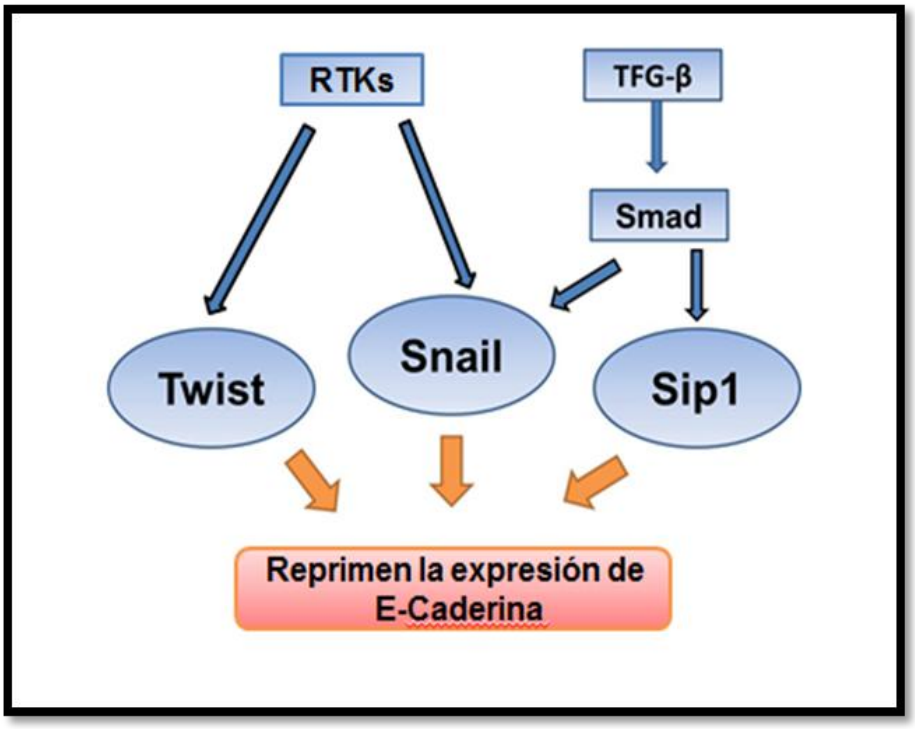
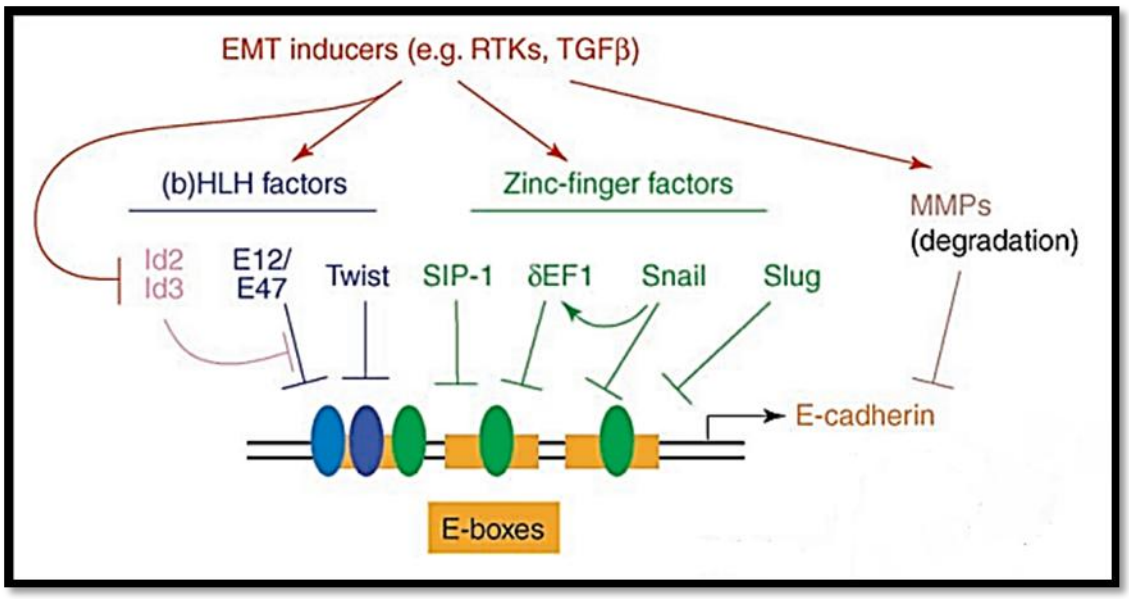
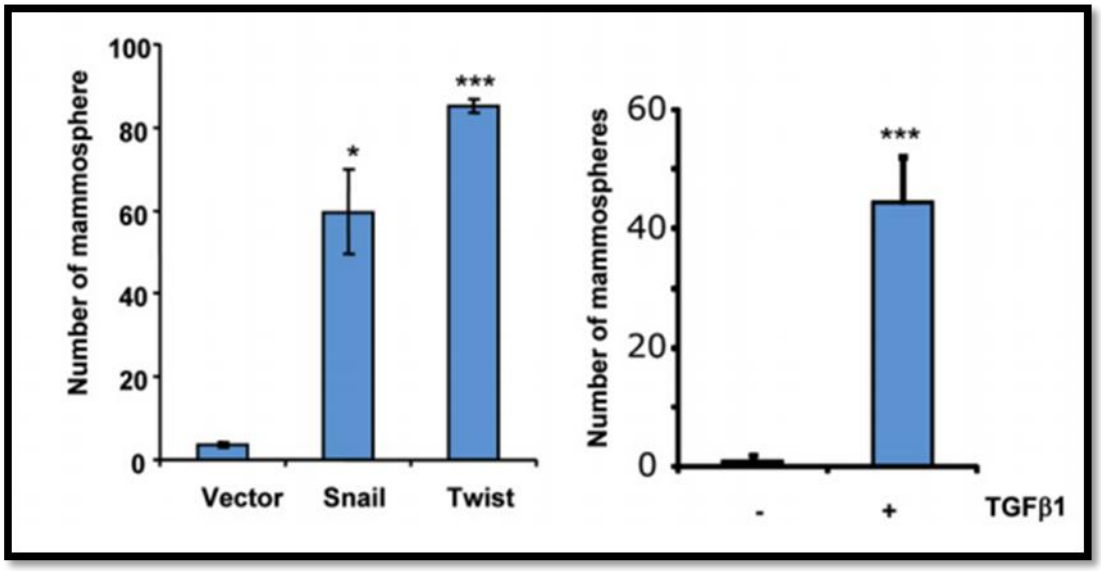



**Figura 4:** Esquema del promotor del gen de E-Cadherina.
Se observa que existen diversos elementos en el promotor del gen de la E-Cadherina como Twist, SIP-1, Snail y Slug, y además, factores de transcripción inductores de la TEM.



**<u>Figura 5:</u> Gráficas de comparación para evidenciar la capacidad de formar mamósferas asociado a la presencia de factores inductores de la TEM.** En las gráficas se observan el número de mamósferas formadas en dos situaciones: en la primera, se comparan el número de mamósferas formadas ante la transfección en la célula de un vector vacío, de los factores de transcripción Snail y Twist, obteniéndose un mayor número de mamósferas ante la actividad de Twist y Snail. En la segunda gráfica, se compara el número de mamósferas formadas ante la inducción de TEM mediante TGFβ-1 y la ausencia de este, obteniéndose una mayor formación de mamósferas ante la presencia de TGFβ-1.




**<u>Figura 6:</u>** Gráfico comparativo en la formación de mamósferas con análisis de las proteínas CD44 y CD24**.** En la figura se muestra el número de mamósferas formadas en células con la conformación antigénica de superficie con CD44 alto y CD24 bajo, y CD44 bajo y CD 24 alto; notándose un incremento en el número de mamósferas formadas en el caso de CD44 alto y CD24 bajo.

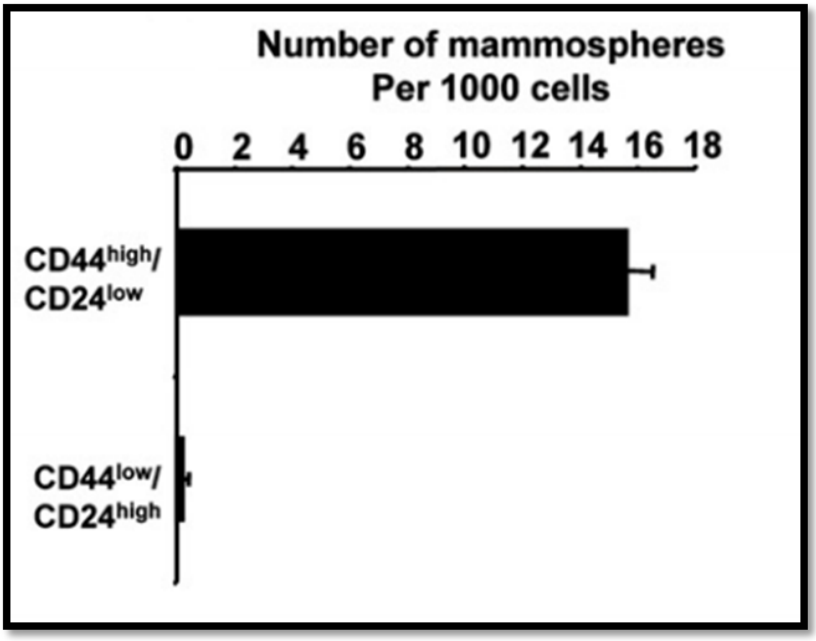
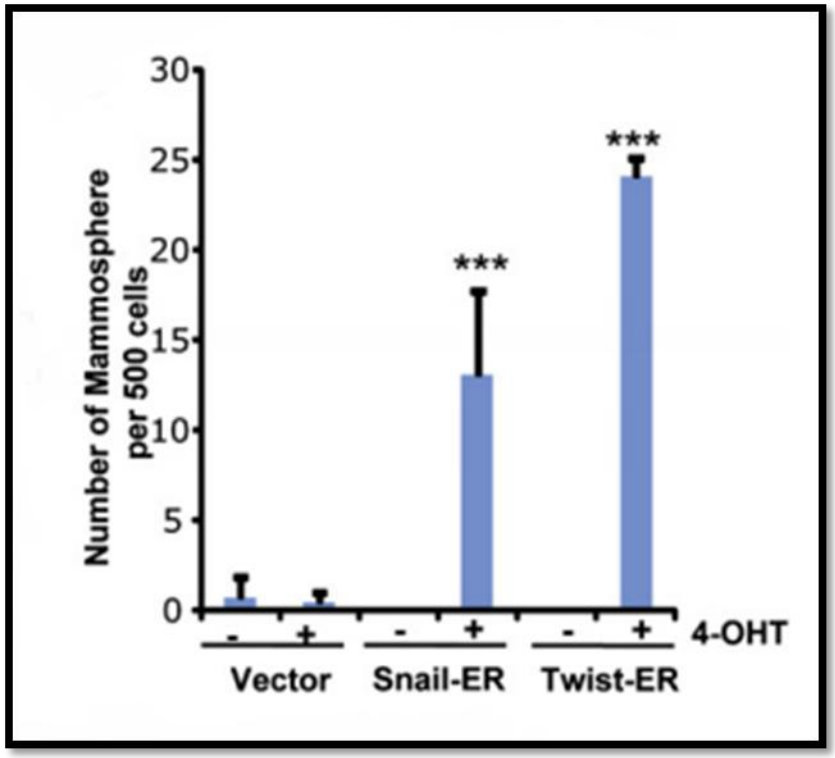



**Figura 7:** Gráfico comparativo que muestra la cantidad de mamósferas formadas en relación a la aplicación de Tamoxífeno en el medio de cultivo.
En un cultivo de células donde se trataron con tamoxífeno, se observa un incremento del número de células que forman mamósferas; debido a la represión de receptor de estrógeno, que a su vez, reprimía la acción los factores de transcripción.