

MECANISMOS DE INMORTALIZACIÓN CELULAR: Aplicaciones a la preservación de la biodiversidad animal

FÁTIMA ASSAIDI, Universidad autónoma de Barcelona. Tutora: Aurora Ruiz-Herrera Moreno

1. Objetivo

Estudiar los sistemas experimentales utilizados en los laboratorios de investigación para inmortalizar células diploides eucariotas de mamíferos basados en la telomerasa y el virus Epstein-Barr, con el fin de obtener un banco de tejidos que contribuya a la preservación de la biodiversidad de las especies animales, así como su aplicación para fines clínicos o incluso para trabajos de investigación.

2. Introducción

Cada vez el número de especies animales que se encuentran en peligro de extinción es más elevado; por lo que los métodos de preservación de la biodiversidad animal han pasado a ser, en los últimos años, objeto de gran interés por la comunidad científica.

Uno de los métodos que se utiliza para llevar a cabo este objetivo es la inmortalización celular. Disponer de líneas celulares mediante técnicas experimentales en los laboratorios constituye una fuente importante de material genético y una herramienta clave para el desarrollo de nuevas estrategias de preservación de las especies animales. El potencial proliferativo de las células eucariotas de mamíferos en cultivo es limitado. Este fenómeno se conoce como senescencia replicativa ya que durante esta fase las células se caracterizan por presentar un detenimiento de su crecimiento en la fase G1 del ciclo celular. Los fibroblastos de mamíferos constituyen el modelo típico para estudiar este fenómeno. Sin embargo, se ha descubierto que en algunas especies, por ejemplo en roedores, se producen daños en el DNA de las células que impiden la respuesta a las señales apoptóticas conduciendo, por lo tanto, a la inmortalización celular. Existen dos mecanismos de inmortalización celular: la inmortalización espontánea y la inmortalización inducida.

Actualmente la telomerasa constituye uno de los mecanismos de inmortalización más utilizados en los laboratorios. Esta enzima, que fue descubierta en 1985, permite la elongación de los extremos teloméricos conduciendo a la inmortalización celular (figura.3). Esta compuesta por una subunidad catalítica con actividad transcriptasa inversa TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*), un componente de RNA que proporciona la plantilla para la síntesis de los nuevos nucleótidos TERC (*Telomerase RNA Component*) y varias proteínas asociadas. Recientemente, se ha visto que es posible transfectar células con subunidades ectópicas de la telomerasa y se ha conseguido su inmortalización. Es lo que se ha hecho con los fibroblastos equinos transfectados con subunidades de telomerasa humanas (figura.1 y figura.2).

Telomerasa

Proceso que permite la inmortalización celular

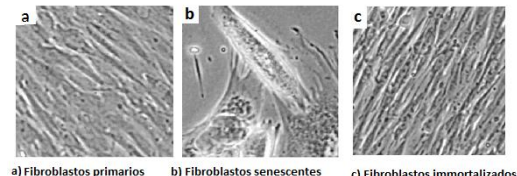
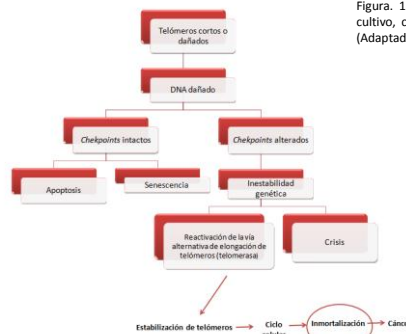


Figura.1: a) Fibroblastos primarios, b) fibroblastos senescentes al cabo de varias PD en cultivo, c) fibroblastos inmortalizados tras la transfección de la subunidad catalítica TERT (Adaptado de Vidale et al. 2012).

Transfección de hTERT y hTERC

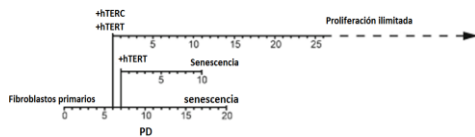


Figura.2: Fibroblastos equinos transfectados con ambas subunidades proliferan a un ritmo rápido sin presentar estado de crisis (Adaptado de Vidale et al. 2012)

Figura.3: Esquema del proceso de inmortalización celular por acción de la telomerasa (Adaptado de Pacini, F. et al. 2011).

El virus Epstein-Barr (EBV) es un virus que pertenece a la familia herpes. Posee un genoma constituido por una molécula lineal de DNA de unos 170 kb que codifica para cerca de 100 proteínas virales que interactúan con las moléculas de las células infectadas y actúan a diferentes niveles del ciclo celular. Se ha observado que la infección de linfocitos B *in vitro* con el EBV, produce una infección latente con inmortalización de las células. Tras la infección de los linfocitos B, el genoma lineal del EB se torna circular, formando un episoma y su genoma habitualmente permanece latente en estas células B. Varios estudios sugirieron que este virus induce una reprogramación epigenética del genoma de las células infectadas conduciendo a una disminución de la metilación de histonas (figura.5). Esta característica promueve la proliferación celular e inhibe la apoptosis conduciendo a la inmortalización celular. Además, se ha descubierto que el EBV presenta una proteína llamada EBNA1 que regula numerosos procesos que afectan al ciclo celular inhibiendo la apoptosis y promoviendo la proliferación celular (figura.4).

5. Epstein-Barr

6. Aplicaciones

La inmortalización celular constituye una herramienta para la preservación de la biodiversidad animal mediante diferentes aplicaciones:

- Crear un banco de líneas celulares.
- Crear una fuente de material genético que será la referencia para estudios de investigación clínica.
- Desarrollar nuevas tecnologías de reproducción asistida gracias al estudio de células en cultivo.
- Material de referencia para realizar proyectos de asociación entre enfermedades y genoma.
- Elaborar nuevos fármacos.
- Idear nuevos métodos de conservación.

7. Conclusión

Las células eucariotas tienen un potencial proliferativo limitado. Sin embargo, gracias a la inducción de mecanismos que permiten el escape de la apoptosis, se puede conseguir la inmortalización celular. Es un sistema experimental que se utiliza en los laboratorios para obtener líneas celulares para su posterior aplicación a estudios clínicos y, constituye una herramienta clave en el desarrollo de nuevas tecnologías de reproducción asistida y por lo tanto, contribuye a la preservación de la biodiversidad animal. No hay que olvidar pero, que queda mucho por recorrer en este ámbito y que muchos de los procesos celulares involucrados están todavía, por conocer.

8. Referencias

-Frappier, L. (2012). Contributions of Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1) to Cell Immortalization and Survival. *Viruses*, 4(9), 1537–1547.
-Hansen, K. D., Sabuncian, S., Langmead, B., Nagy, N., Curley, R., Klein, G., ... Feinberg, A. P. (2013). Large-scale hypomethylated blocks associated with Epstein-Barr virus-induced B-cell immortalization. *Genome Research*, 24(2), 177–184.
-Vidale, P., Magnani, L., Nergadze, S. G., Santagostino, M., Cristofari, G., Smirnova, A., ... Giulotto, E. (2012). The catalytic and the RNA subunits of human telomerase are required to immortalize equid primary fibroblasts. *Chromosoma*, 121(5), 475–488.

Patrones de metilación en las células activadas, las células inactivas y las células B inmortalizadas por el EBV

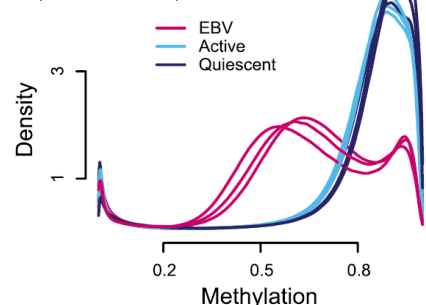


Figura.5: Patrones de metilación de las células activadas, las células inactivas y las células B inmortalizadas por el EBV. Vemos como las células inmortalizadas por el EBV presentan una metilación menor respecto al resto de células (Adaptado de Hansen et al., 2013)