

## SEÑALIZACIÓN WNT/ $\beta$ -CATENINA: UNA BREVE DESCRIPCIÓN DE SU IMPORTANCIA EN EL CULTIVO DE ORGANOIDES

WNT/ B-CATENIN SIGNALING: A BRIEF DESCRIPTION OF ITS IMPORTANCE IN THE CULTURE OF ORGANOIDES

Salyoc Tapia-Rojas<sup>1</sup>, Ana Mayanga-Herrera<sup>1</sup>, José Amiel-Pérez<sup>1</sup>

En la actualidad, los cultivos celulares son una herramienta muy importante para la investigación de diferentes enfermedades como modelos de estudio. Los primeros cultivos celulares comenzaron a finales del siglo XIX con los experimentos de Ringer (1), quien desarrolló una solución balanceada de sales para el mantenimiento de células; luego, un problema de estos cultivos era la baja supervivencia de las células en esos medios (2), por lo que diferentes investigadores comenzaron a generar líneas celulares, las cuales son células que se dividen infinitamente debido a una mutación natural o inducida a fin de evadir la senescencia celular. La primera línea celular humana fue generada por George Gey y sus colaboradores en 1951, quienes cultivaron células de un tumor de cáncer cervical de la paciente llamada Henrietta Lacks (3), hoy conocidas como células HeLa.

A partir de ese momento se establecieron más líneas de diferentes orígenes, las cuales son bastante utilizadas en todo el mundo. La mayoría son cultivadas

y expandidas en placas Petri, tratadas previamente para brindarles las características necesarias para que las células puedan adherirse a su superficie y disponerse en monocapa. A este tipo de cultivos se los denomina cultivos en 2D. Sin embargo, presentan como principal desventaja que no imitan completamente las condiciones fisiológicas ni morfológicas de los tejidos de los que provienen, puesto que estos se organizan espacialmente en estructuras tridimensionales (4).

Por esa razón, diversos investigadores buscan alternativas de modelos de estudio. Entre los principales tenemos los modelos *in vivo*, en los cuales se emplea animales para estudiar diferentes enfermedades, pero tienen como consecuencia el sacrificio de animales inocentes (5). Hoy en día se vienen desarrollando modelos *in vitro* en cultivos 3D para el estudio de diferentes enfermedades, entre los que tenemos los esferoides y los organoides. Estos últimos son una herramienta revolucionaria

<sup>1</sup> LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR E INMUNOLOGÍA, INSTITUTO DE MEDICINA REGENERATIVA, UNIVERSIDAD CIENTÍFICA DEL SUR, LIMA, PERÚ.

debido a que imitan cercanamente las condiciones celulares y microambientales del órgano de origen, por lo cual están siendo adoptados a nivel mundial por su versatilidad e innovación (6). Los organoides son producidos a partir de células madre pluripotentes, como las embrionarias, que se ubican dentro de la masa celular interna del blastocisto, y también de células madre pluripotentes inducidas (iPSc, por sus siglas en inglés), las cuales se obtienen a partir de células somáticas diferenciadas que son reprogramadas a un estado inicial de pluripotencia usando los factores de transcripción Sox2, Oct4, Klf-4, c-myc. Estos factores son denominados de Yamanaka en honor a su descubridor, el Dr. Shinya Yamanaka, Premio Nobel de Medicina en el 2012 (7).

Además, los organoides también pueden ser obtenidos a partir de células madre adultas que poseen en su superficie al marcador Lgr5+ (8). Uno de los pioneros y más reconocidos en el estudio de estos organoides es el Dr. Hans Clevers, quien junto a su equipo ha desarrollado organoides de intestino, colon, estómago, pulmón, entre otros (9). Para lograrlo, principalmente, tuvo que estandarizar medios de cultivo apropiados que contengan los nutrientes y factores necesarios para la formación de estos organoides a partir de las células madre (10). Un componente principal de estos medios de cultivo especializados es el ligando Wnt, el cual pertenece a la familia de proteínas Wnt y debe su nombre a la fusión de las palabras wingless (gen de *Drosophila melanogaster*) e Int-1 (oncogen de *Mus musculus*).

Estas proteínas transducen su señal mediante tres vías de señalización: una vía canónica ( $\beta$  catenina-dependiente) y dos vías no canónicas ( $\beta$ catenina-independientes). De estas últimas, la vía Wnt-Ca<sup>2+</sup> se activa con la unión de los ligandos Wnt a través de los receptores

Frizzled (Fz) 2, 7 o Ror2 para incrementar los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular, con lo que se regula la migración y la proliferación celular. La otra vía, Wnt-Polaridad planar celular (PCP), se activa con la unión de los ligandos Wnt a través de varios de los receptores Fz que desencadenan una cascada de señales para la organización del citoesqueleto, la migración celular y la polaridad de los tejidos (figura 1).

La familia Wnt también se puede dividir en dos categorías de acuerdo con la vía de señalización Wnt que activan: Wnt1, conformada por las proteínas Wnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt7a, Wnt8, Wnt8b y Wnt10a, que están involucradas en la vía de señalización Wnt canónica; y Wnt5a, conformada por Wnt4, Wnt5a y Wnt11, que activan la vía de señalización Wnt no canónica. La gran mayoría de los ligandos Wnt son lipidados o prenilados en el retículo endoplasmático, es decir, se le adiciona moléculas hidrofóbicas, lo cual restringe su difusión.

La vía de señalización Wnt canónica es también conocida como vía Wnt/b-catenina, esta vía es importante en la proliferación, diferenciación y mantenimiento de células madre, en donde la  $\beta$ -catenina actúa como coactivador; además, esta desempeña un papel importante en la organización estructural como intermedia en la adhesión del citoesqueleto (actina) y la unión célula-célula mediada por E-cadherina. Estas dos funciones en conjunto son importantes para la regulación del eje embrionario, así como la diferenciación de las células madre.

Se dice que la vía Wnt/b catenina se encuentra inactiva cuando hay ausencia de los ligandos Wnt, lo cual ocasiona que la proteína  $\beta$ -catenina citoplasmática se degrade constantemente por la acción del complejo Axin, constituido por las proteínas Axin, APC, GSK3 y CK1. Estas dos últimas son las responsables

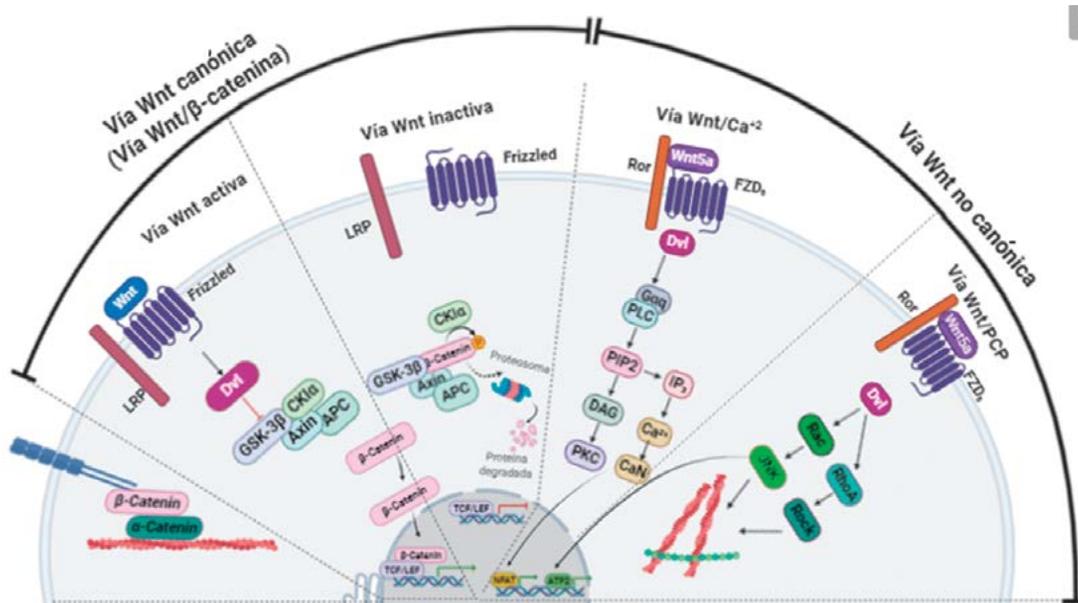


FIGURA 1. RESUMEN GRÁFICO DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN WNT, REGULACIÓN Y MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS EN EL MANTENIMIENTO DE LAS PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS MADRE (IMAGEN CREADA CON BIORENDER.COM)

de fosforilar la región amino-terminal de la  $\beta$ -catenina, para su reconocimiento y ubiquitinación por b-TRCP, y la posterior degradación proteasómica.

Por otro lado, la vía Wnt /  $\beta$ -catenina se activa cuando el ligando Wnt es reconocido por el receptor Frizzled (FZD) y su correceptor, la proteína LRP6/5, para formar el complejo Wnt/FZD/LRP6/5, el cual se une a la proteína dishevelled (Dvl) y activa la LRP6, y posteriormente recluta al complejo Axin. Como consecuencia, la proteína  $\beta$ -catenina dejará de ser fosforilada y por tanto esta podrá ser trasladada al núcleo para unirse al complejo TCF/LEF e iniciar la transcripción de los genes relacionadas con esta vía.

La señalización Wnt /  $\beta$ -Catenina está íntimamente relacionada con el mantenimiento de muchas poblaciones de células madre; además, diversos estudios han reportado mejoras en la reprogramación de células diferenciadas mediante el uso del ligando Wnt para la obtención de las iPSCs. Esta vía también es importante

en el cultivo y mantenimiento de organoides. Diversos organoides han sido desarrollados, los primeros de los cuales fueron los intestinales creados por Sato y Clevers en el 2009. Ellos observaron que el epitelio intestinal se renueva periódicamente de una manera continua debido al daño constante que sufre. Este tejido posee estructuras denominadas criptas de Lieberkuhn, en cuyo fondo se encuentran células madre adultas Lgr5+, que son las responsables de la regeneración del tejido epitelial intestinal y vecinas de estas, se encuentran principalmente las células de Panneth y células estromales/mesenquimales, las cuales en conjunto brindan los factores necesarios para mantener la comunicación en el nicho celular y aseguran un gradiente de concentración de Wnt que va desde el fondo de la cripta como punto máximo de concentración para estimular la proliferación homeostática y la autorrenovación de las células madre adultas, y disminuyen gradualmente para permitir la diferenciación celular en las partes superiores de la cripta.

Por esa razón, Sato y Clevers aislaron a las células basadas en el marcador Lgr5 y observaron que una sola de estas (11), con los factores de crecimiento y entorno correcto, podía dar lugar a células hijas de todos los tipos celulares intestinales, que se disponen de manera muy parecida al tejido intestinal y dan lugar a la formación de estructuras tridimensionales a las que hoy se conoce como organoides intestinales.

Estos permitieron profundizar en el estudio de los componentes necesarios para su formación, como el ligando Wnt, R-spondin, Noggin y el factor de crecimiento epidérmico (EGF); asimismo, contribuyeron a la comprensión de los mecanismos moleculares relacionados con la vía de señalización Wnt/b-catenina. Clevers et al. ahondaron en el estudio de las funciones del marcador Lgr5 y su relación con la señalización Wnt, y observaron que, en ausencia de R-spondin, el complejo Wnt era degradado por las ubiquitininas ZRNF3/RNF43, lo que provocaba la inhibición de la cascada de señalización Wnt; mientras que, en presencia de R-spondin, se une al receptor Lgr5 y luego este complejo se une a las ubiquitininas ZRNF3/RNF43. De este modo se inhibe la degradación del complejo Wnt, lo cual permite que la cascada de señalización Wnt se mantenga activa y que se sigan transcribiendo los genes blanco de esta vía, entre ellos LGR5 y RNF43, para formar un bucle de retroalimentación reguladora (12).

Si bien la señalización Wnt es muy importante, son necesarios también factores que inhiban la señalización BMP (*Bone Morphogenic Protein*), entre estos, Gremlin 1 y Noggin, que son secretados por las células mesenquimales que rodean la base de las criptas; estos antagonizan al BMP de modo que se mantiene el *stemness* de las células madre intestinales y también se continúa con la expansión de las criptas (13).

La comprensión de esta vía de señalización ha permitido el desarrollo de una gran mayoría de organoides y para desarrollar este tipo de cultivo son necesarias tres cosas: células madre, matriz extracelular y medio de cultivo especializado.

De acuerdo con lo descrito, los organoides pueden ser desarrollados a partir de células madre embrionarias, pluripotentes inducidas o adultas. La matriz extracelular brinda el soporte y las señales necesarias a las células que formarán el organoide, entre las cuales la más conocida y utilizada es el matrigel®, que es una mezcla de proteínas secretada por el sarcoma de ratón, llamado inicialmente sarcoma EHS debido a sus descubridores Engelbreth, Holm y Swarm. Sin embargo, presenta la desventaja de tener origen animal y una composición no definida, por lo que en la actualidad se viene reemplazando su uso por matrices sintéticas químicamente definidas, lo que asegura el buen crecimiento de los organoides y la reproducibilidad de los ensayos (14).

Los medios especializados están compuestos en función del tipo de organoide que se desee generar, pero una gran mayoría contiene tres factores esenciales para mantener a la mayoría de organoides en constante expansión. Entre ellos tenemos al ligando Wnt3a, R-spondin y Noggin. Las señales endógenas de Wnt, particularmente Wnt3a, son necesarias para la activación de la vía Wnt canónica. Recordemos que los ligandos Wnt son hidrófobos y forman agregados en medios libres de suero; por ello, su actividad es ineficiente, lo que obliga al uso de medios condicionados que contienen suero. Pero este medio condicionado mantenía la desventaja de tener una composición desconocida; por ello, Mihara et al. (15) identificaron que la afamina, presente en el suero, era la responsable de estabilizar y mejorar la actividad de Wnt a través de la forma-

ción de un complejo y la activación de la vía Wnt canónica. Además de la afamina, también son usados fosfolípidos y colesterol como transportadores del Wnt3a (16). El segundo componente principal del medio especializado es la R-spondina, la cual es un agonista de Wnt y tiene como función amplificar la señalización de Wnt/b-catenina para mantener así el estado troncal de las células madre intestinales y estimular la proliferación celular (17). Por último, Noggin es un inhibidor de la señalización de BMP y estimula la expansión del número de criptas intestinales (18). Estos tres componentes descritos son conocidos en conjunto como WRN, debido a las iniciales de cada uno (W: Wnt3a, R: R-spondin y N: Noggin).

Un factor adicional importante en el medio de cultivo es el factor de crecimiento

epidermal (EGF), debido a que induce la proliferación celular y la angiogénesis a través de la señalización de PI3K / Akt, ErbB y MAPK / ERK, por lo que es un factor importante para la homeostasis y la regeneración de células madre.

En conclusión, la vía Wnt, como lo mencionan Vincan et al. (19), es el corazón de la tecnología organoide; su estudio ha permitido el desarrollo del cultivo de organoides, los cuales son una gran herramienta innovadora y prometedora para el trasplante y la medicina regenerativa. Además, son de gran importancia para el estudio del cáncer y el descubrimiento de nuevos fármacos personalizados contra esta enfermedad, debido a que la desregulación de la vía Wnt/b-catenina está involucrada en la aparición de varios tipos de cáncer.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ringer S. Concerning the influence exerted by each of the constituents of the blood on the contraction of the ventricle. *J Physiol.* 1882; 3 (5-6): 380.
2. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res.* 1961; 25 (3): 585-621.
3. Lyapun IN, Andryukov BG, Bynina MP. HeLa Cell Culture: Immortal Heritage of Henrietta Lacks. *Mol Genet Microbiol Virol.* 2019;34:195–200.
4. Kapałczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, et al. 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch Med Sci AMS.* 2018; 14 (4): 910.
5. Denayer T, Stöhr T, Van Roy M. Animal models in translational medicine: Validation and prediction. *New Horizons Transl Med.* 2014; 2 (1): 5-11.
6. Fang Y, Eglen RM. Three-dimensional cell cultures in drug discovery and development. *Slas Discov Adv Life Sci R&D.* 2017; 22 (5): 456-72.

7. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006; 126 (4): 663-76.
8. Sato T, Vries RG, Snippert HJ, Van De Wetering M, Barker N, Stange DE, et al. Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*. 2009; 459 (7244): 262-5.
9. Schutgens F, Clevers H. Human organoids: tools for understanding biology and treating diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2020; 15: 211-34.
10. Holmberg FEO, Seidelin JB, Yin X, Mead BE, Tong Z, Li Y, et al. Culturing human intestinal stem cells for regenerative applications in the treatment of inflammatory bowel disease. *EMBO Mol Med*. 2017; 9 (5): 558-70.
11. Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science*. 2013; 340 (6137): 1190-4.
12. De Lau W, Peng WC, Gros P, Clevers H. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. *Genes Dev*. 2014; 28 (4): 305-16.
13. Merker SR, Weitz J, Stange DE. Gastrointestinal organoids: how they gut it out. *Dev Biol*. 2016; 420 (2): 239-50.
14. Vazin T, Schaffer DV. Engineering strategies to emulate the stem cell niche. *Trends Biotechnol*. 2010; 28 (3): 117-24.
15. Mihara E, Hirai H, Yamamoto H, Tamura-Kawakami K, Matano M, Kikuchi A, et al. Active and water-soluble form of lipidated Wnt protein is maintained by a serum glycoprotein afamin/ $\alpha$ -albumin. *Elife*. 2016; 5: e11621.
16. Tüysüz N, Van Bloois L, Van Den Brink S, Begthel H, Verstegen MMA, Cruz LJ, et al. Lipid-mediated Wnt protein stabilization enables serum-free culture of human organ stem cells. *Nat Commun*. 2017; 8 (1): 1-11.
17. Koo B-K, Clevers H. Stem cells marked by the R-spondin receptor LGR5. *Gastroenterology*. 2014; 147 (2): 289-302.
18. Qi Z, Li Y, Zhao B, Xu C, Liu Y, Li H, et al. BMP restricts stemness of intestinal Lgr5+ stem cells by directly suppressing their signature genes. *Nat Commun*. 2017; 8 (1): 1-14.
19. Vincan E, Schwab RHM, Flanagan DJ, Moselen JM, Tran BM, Barker N, et al. The central role of Wnt signaling and organoid technology in personalizing anticancer therapy. En: *Progress in molecular biology and translational science*. Nueva York: Elsevier; 2018. p. 299-319.

RECIBIDO: 05.08.2020

ACEPTADO: 24.10.2020

CORRESPONDENCIA: [salyoc.tapia@unmsm.edu.pe](mailto:salyoc.tapia@unmsm.edu.pe) (SALYOC TAPIA-ROJAS)