



CENTRO INTERNACIONAL DE ESTUDOS  
DE DOUTORAMENTO E AVANZADOS  
DA USC (CIEDUS)

TESIS DE DOCTORADO

# REPROGRAMACIÓN CELULAR Y CÁNCER

Alba Ferreirós López

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL  
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA  
AÑO 2018



DECLARACIÓN DEL AUTOR DE LA TESIS  
REPROGRAMACIÓN CELULAR Y CÁNCER

Dña Alba Ferreirós López

*Presento mi tesis, siguiendo el procedimiento adecuado al Reglamento, y declaro que:*

- 1) *La tesis abarca los resultados de la elaboración de mi trabajo.*
- 2) *En su caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.*
- 3) *La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide con la versión enviada en formato electrónico.*
- 4) *Confirmando que la tesis no incurre en ningún tipo de plagio de otros autores ni de trabajos presentados por mí para la obtención de otros títulos.*

*En Santiago de Compostela, 2 de abril de 2018*



Fdo. Alba Ferreirós López



AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/TUTOR DE LA TESIS  
REPROGRAMACIÓN CELULAR Y CÁNCER

D. Manuel Collado Rodríguez y D. Anxo Vidal Figueroa

INFORMAN:

*Que la presente tesis, corresponde con el trabajo realizado por Dña. **Alba Ferreirós López**, bajo mi dirección, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director de ésta no incurre en las causas de abstención establecidas en Ley 40/2015.*

*En Santiago de Compostela, 2 de abril de 2018*



Fdo. Manuel Collado Rodríguez



Fdo. Anxo Vidal Figueroa



Alba Ferreirós López, autora de la presente tesis,  
declaro que no existe ningún conflicto de interés.





La reprogramación celular permite desdiferenciar las células somáticas hasta el estado pluripotente. El estudio de este proceso aporta información muy valiosa sobre la identidad celular y resulta de gran utilidad como herramienta para la investigación biomédica de distintas patologías.

Los procesos de reprogramación celular y transformación oncogénica comparten muchas similitudes. Sin embargo, las nuevas identidades celulares establecidas mediante estos procesos son incompatibles entre sí. Las células tumorales presentan barreras, todavía no identificadas, que se oponen a la reprogramación. La identificación de estas barreras podría aportar nuevos aspectos acerca de la identidad tumoral. Además, la reprogramación de estas células generaría valiosos modelos para la investigación oncológica.

En este trabajo analizamos el efecto de la activación oncogénica sobre la reprogramación celular. Nuestros resultados muestran cómo la activación oncogénica combinada con los factores de reprogramación, en un contexto no tumoral, favorece la generación de células iPS mediante el establecimiento de un estado más plástico, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Por el contrario, cuando esta misma activación oncogénica se produce en un contexto que permite la adquisición del estado transformado, se bloquea la reprogramación celular al imponerse nuevas barreras características de las células tumorales.

Estos resultados indican que el establecimiento de una nueva identidad celular transformada genera un estado que es incompatible con la reprogramación. La expresión de los factores de reprogramación en estas células pone en riesgo esta nueva identidad, lo que provoca una disminución de la capacidad tumorogénica.

En conjunto, esta tesis muestra el efecto diferencial de la activación oncogénica sobre el proceso de reprogramación en función del contexto en el que se produzca.



A reprogramación celular permite desdiferenciar as células somáticas ata o estadio pluripotente. O estudo deste proceso aporta información moi valiosa sobre a identidade celular e resulta de gran utilidade como ferramenta para a investigación biomédica de distintas patoloxías.

Os procesos de reprogramación celular e transformación oncoxénica comparten moitas semellanzas. Así e todo, as novas identidades celulares establecidas mediante estes procesos son incompatibles entre si. As células tumorais presentan barreiras, aínda non identificadas, que se opoñen á reprogramación. A identificación destas barreiras podería aportar novos aspectos sobre a identidade tumoral. Ademais, a reprogramación destas células xeraría valiosos modelos para a investigación oncolóxica.

Neste traballo analizamos o efecto da activación oncoxénica sobre a reprogramación celular. Os nosos resultados mostran cómo a activación oncoxénica combinada cos factores de reprogramación nun contexto non tumoral, favorece a xeración de células iPS mediante o establecemento dun estado máis plástico, tanto *in vitro* como *in vivo*.

Pola contra, cando esta mesma activación oncoxénica se produce nun contexto que permite a adquisición do estado transformado, bloquéase a reprogramación celular ao impoñerse novas barreiras características das células tumorais.

Estos resultados indican que o establecemento dunha nova identidade celular transformada xera un estado que é incompatible coa reprogramación. A expresión dos factores de reprogramación nestas células pon en risco esta nova identidade, o que provoca a diminución da capacidade tumoroxénica.

En conxunto, esta tese mostra o efecto diferencial da activación oncoxénica sobre o proceso de reprogramación en función do contexto no que se produza.



Cellular reprogramming allows dedifferentiating somatic cells up to the pluripotency state. The study of this process provides very valuable information regarding cell identity and is very useful as a tool for biomedical research in a number of pathologies.

The processes of cellular reprogramming and oncogenic transformation share many similarities. However, the new cellular identities established through these mechanisms are not compatible with each other. Tumor cells have barriers, still not identified, opposing reprogramming. Identification of these barriers could contribute new aspects related with tumor cell identity. In addition, reprogramming of these cells would provide new valuable models for oncology research.

In this work, we analyze the effect of oncogene activation on cellular reprogramming. Our results show how oncogene activation combined with the expression of the reprogramming factors, in a non-tumor context, favors the generation of iPS cells by establishing a more plastic state, both *in vitro* and *in vivo*.

In contrast, when this same oncogenic activation occurs in a context allowing the acquisition of the transformed state, cellular reprogramming is blocked by new barriers representing specific features of the tumor cells.

These results indicate that the establishment of a new transformed cell identity generates a state that is incompatible with reprogramming. The expression of reprogramming factors in these cells puts this new identity at risk, causing a decrease in the tumorigenic capacity.

Altogether, this thesis shows the differential effect of oncogenic activation on the reprogramming process depending on the context in which it occurs.



<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
<b>1. IDENTIDAD CELULAR Y PLASTICIDAD.....</b>	<b>9</b>
<b>2. REPROGRAMACIÓN CELULAR .....</b>	<b>11</b>
2.1. Inicios de la reprogramación celular .....	11
2.2. Reprogramación celular a iPSC .....	12
2.3. Sistemas alternativos .....	14
2.4. Reprogramación <i>in vivo</i> .....	15
<b>3. CÁNCER.....</b>	<b>16</b>
3.1. Características del cáncer.....	16
3.2. Oncogenes: la familia Ras.....	18
3.2.1. Regulación de las proteínas Ras .....	19
3.2.2. Ras en cáncer .....	20
3.2.3. Vías de señalización intracelular.....	21
3.2.4. Funciones de Ras .....	23
3.3. Mecanismos supresores de tumores.....	24
3.3.1. Inhibidores de Cdks .....	24
3.3.2. Proteínas pocket de la familia de retinoblastoma .....	27
3.3.3. El guardián del genoma, p53 .....	28
3.4. Senescencia inducida por oncogenes.....	29
3.5. Cooperación oncogénica .....	31
3.6. Células madre en cáncer .....	32
3.7. Modelos animales para el estudio del cáncer .....	33
3.7.1. Modelos animales de activación genética del cáncer.....	33
3.7.2. Modelos animales de carcinogénesis química .....	34
<b>4. REPROGRAMACIÓN CELULAR Y CÁNCER .....</b>	<b>35</b>
4.1. Células iPS y células tumorales .....	35
4.2. Mecanismos comunes.....	36
4.2.1. Factores de transcripción .....	36
4.2.2. Remodelado epigenético.....	38
4.3. Barreras comunes.....	39
4.3.1. El guardián del genoma, p53 .....	40
4.3.2. Locus <i>Ink4/Arf</i> .....	40
4.4. Mecanismos implicados en la reprogramación celular <i>in vivo</i> ...	41
<b>5. REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES.....</b>	<b>44</b>
5.1. Reprogramación de células tumorales mediante SCNT .....	44

# ÍNDICE

5.2. Reprogramación celular a iPSC .....	45
5.2.1. Contribución del componente epigenético .....	47
5.2.2. Modelos de desarrollo tumoral .....	47
5.2.3. Desarrollo de nuevas terapias .....	48
5.2.4. Reprogramación como terapia .....	49
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>51</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
<b>1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....</b>	<b>57</b>
1.1. Condiciones de estabulación .....	57
1.2. Ratón reprogramable i4F .....	57
1.3. Ratón KrasV12-KI .....	58
1.4. Ratones NRMI-nu “nude” .....	58
1.5. Genotipado .....	59
<b>2. PROTOCOLOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL .....</b>	<b>60</b>
2.1. Tratamiento con doxiciclina <i>in vivo</i> .....	60
2.1.1. Doxiciclina en agua de bebida .....	60
2.1.2. Doxiciclina en crema .....	61
2.2. Administración intratraqueal de Ad-Cre .....	61
2.3. Tratamiento con DMBA .....	61
2.4. Inyección de 3-MCA .....	61
2.5. Inyección de células .....	62
2.5.1. Inyección de células en riñón .....	62
2.5.2. Inyección subcutánea .....	62
<b>3. CULTIVOS CELULARES .....</b>	<b>62</b>
3.1. Cultivo primario de MEFs wt, i4F, p53-null y Arf-null .....	62
3.2. Derivación de líneas celulares de fibrosarcoma .....	63
3.3. Cultivo celular de iPSC y ESC .....	64
3.4. Líneas celulares .....	64
3.5. Preparación de <i>feeders</i> .....	64
3.6. Tratamientos .....	65
<b>4. VECTORES PLASMÍDICOS .....</b>	<b>65</b>
4.1. Microorganismos empleados .....	65
4.2. Medios de cultivo bacterianos empleados .....	66
4.4. Plásmidos .....	66
<b>5. TRANSDUCCIÓN RETROVIRAL Y LENTIVIRAL .....</b>	<b>68</b>
5.1. Transfección celular .....	68
5.2. Transducción .....	68

<b>6. REPROGRAMACIÓN CELULAR .....</b>	<b>69</b>
6.1. Reprogramación de MEFs i4F .....	69
6.2. Reprogramación con vectores retrovirales .....	69
6.3. Reprogramación con vectores lentivirales .....	69
<b>7. TINCIÓN FOSFATASA ALCALINA (AP) .....</b>	<b>70</b>
<b>8. PICADO Y EXPANSIÓN DE COLONIAS iPSCS .....</b>	<b>70</b>
<b>9. PROTOCOLOS DE DIFERENCIACIÓN .....</b>	<b>71</b>
9.1. Diferenciación <i>in vitro</i> : formación de <i>embryoid bodies</i> .....	71
9.2. Diferenciación <i>in vivo</i> : formación de teratomas .....	71
<b>10. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE mRNA .....</b>	<b>72</b>
10.1. Extracción de RNA .....	72
10.2. Síntesis de cDNA mediante retrotranscripción .....	72
10.3. qRT-PCR .....	72
<b>11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA .....</b>	<b>74</b>
11.1. Extracción de proteínas .....	74
11.2. Cuantificación de proteínas .....	75
11.3. <i>Western blot</i> .....	75
<b>12. PULL-DOWN RAS-GTP .....</b>	<b>76</b>
12.1. Preparación del sistema de sefarosa con la proteína RalGDS- RBD fusionada a GST .....	76
12.2. <i>Pull-down</i> a partir de extractos proteicos .....	77
<b>13. ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS .....</b>	<b>77</b>
<b>14. TRATAMIENTO CON MEDIOS CONDICIONADOS .....</b>	<b>78</b>
<b>15. COCULTIVO .....</b>	<b>78</b>
<b>16. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD <math>\beta</math>-GALACTOSIDASA ASOCIADA A SENESCENCIA (SA- <math>\beta</math>-GAL) .....</b>	<b>78</b>
16.1. Ensayo con sustrato quimioluminiscente, Galactón. ....	78
16.2. Ensayo con sustrato cromogénico, X-Gal. ....	79
<b>17. ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO .....</b>	<b>80</b>
17.1. Procesado de tejidos .....	80
17.2. Tinción hematoxilina-eosina (H&E) .....	80
17.3. Inmunohistoquímica de secciones de tejido incluidas en parafina .....	80
<b>18. MICROSCOPIA .....</b>	<b>81</b>

19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	81
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>83</b>
1. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE ONCOGENES ACTIVOS EN LA REPROGRAMACIÓN CELULAR .....	85
1.1. Efecto de la activación oncogénica sobre la reprogramación <i>in vitro</i> .....	85
1.1.1. Ras oncogénico aumenta la eficiencia de reprogramación ....	85
1.1.2. La vía MAPK/ERK es la responsable del efecto de Ras sobre reprogramación .....	90
1.1.3. Activación de la vía endógena de Ras durante la reprogramación celular .....	93
1.1.4. Senescencia durante la reprogramación con Ras .....	96
1.1.5. Cambios en la dinámica del proceso de reprogramación provocados por la expresión de Ras oncogénico .....	98
1.1.6. Cambios en la expresión génica inducidos por Ras oncogénico de manera independiente de OSKM .....	100
1.1.7. El efecto de Ras sobre reprogramación es extrínseco a la célula .....	102
1.2. Efecto de la activación oncogénica sobre la reprogramación <i>in vivo</i> .....	107
1.2.1. Modelos animales de activación genética de cáncer .....	107
1.2.2. Modelos animales de carcinogénesis química .....	111
1.2.2.1. Tratamiento con DMBA en piel .....	112
1.2.2.2. Inyección intramuscular de 3-MCA .....	114
2. REPROGRAMACIÓN CELULAR DE CÉLULAS TRANSFORMADAS .....	118
2.1. Reprogramación de células transformadas <i>in vitro</i> .....	118
2.1.1. La expresión de Ras oncogénico en células inmortales impone una barrera a la reprogramación celular .....	118
2.1.2. Cambios en la expresión génica inducidos por Ras oncogénico en MEFs p53-null de manera independiente de OSKM .....	120
2.1.3. Efecto paracrino de células p53-null expresando Ras .....	121
2.1.4. Desarrollo de un sistema celular reversible de transformación .....	123
2.2. Reprogramación de líneas tumorales de fibrosarcoma .....	128
2.2.1. Reprogramación de líneas tumorales de fibrosarcoma <i>in vitro</i> .....	129
2.2.2. Reprogramación de líneas tumorales de fibrosarcoma <i>in vivo</i> .....	131

<i>2.2.3. Efecto de la expresión de los factores OSKM sobre el desarrollo tumoral</i> .....	133
<b><i>DISCUSIÓN</i></b> .....	<b>137</b>
<b><i>CONCLUSIONES</i></b> .....	<b>151</b>
<b><i>BIBLIOGRAFÍA</i></b> .....	<b>155</b>





## ABREVIATURAS

- AP:** *Alkaline phosphatase*. Fosfatasa alcalina
- APS:** *Ammonium persulfate*. Persulfato amónico
- Arf:** *Alternative Reading Frame*. Pauta de lectura alternativa
- BSA:** *Bovine serum albumin*. Albúmina sérica bovina
- CDC25:** *Cell Division Cycle 25*.
- Cdk:** *Cyclin Dependent Kinases*. Quinasas dependientes de ciclinas
- Cdkn:** *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor*. Inhibidor de quinasa dependiente de ciclina
- cDNA:** *Complementary DNA*. ADN complementario
- Ck1e1/ae3:** *Citokeratin Ae1/Ae3*. Citoqueratina Ae1/Ae3
- CML:** *Chronic Myeloid Leukemia*. Leucemia mieloide crónica
- c-Myc:** *Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*. Homólogo al oncogén viral de la mielocitomatosis aviar.
- CSC:** *Cancer Stem Cells*. Células madre del cáncer
- CTX:** *Cardiotoxin*. Cardiotoxina
- Dlx3:** *Distal-Less Homeobox 3*.
- DMBA:** *7,12-Dimethylbenzanthracene*. 7, 12-dimetilbenzantraceno
- DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*. Medio de Eagle modificado por Dulbecco.
- DMSO:** *Dimethyl Sulfoxide*. Dimetilsulfóxido
- DNA:** *Deoxyribonucleic Acid*. Ácido desoxirribonucleico
- Dot1L:** *Disruptor Of Telomeric silencing 1-like*
- Dox:** *Doxycycline*. Doxiciclina
- Dppa3:** *Developmental Pluripotency Associated 3*
- DTT:** *Dithiothreitol*. Ditiotreitól
- EB:** *Embryoid Bodies*. Cuerpos embrioides
- ECL:** *Enhanced chemiluminescence*. Quimioluminiscencia mejorada
- EDTA:** *Ethylenediamine tetraacetic acid*. Ácido etilendiaminotetraacético
- EMT:** *Epithelial-mesenchymal transition*. Transición epitelio-mesénquima
- Erk1/2:** *Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2*. Quinasa Regulada por señales extracelulares 1/2
- ESC:** *Embryonic Stem Cells*. Células madre embrionarias
- Essrb:** *Estrogen Related Receptor Beta*.

## ABREVIATURAS

**ETS:** *E26 transformation-specific*

**EV:** *Empty Vector*. Vector vacío

**E1a:** *Adenoviral early region 1A*

**E2F:** *E2 factor*

**FBS:** *Fetal Bovine Serum*. Suero fetal bovino

**Fn1:** *Fibronectin 1*

**GAP:** *GTPase-activating protein*. Proteína activadora de GTPasa

**Gapdh:** *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*

**Gata4:** *GATA Binding Protein 4*

**Gata6:** *GATA Binding Protein 6*

**GBM:** *Glioblastoma*

**GDP:** *Guanosine Diphosphate*. Guanosín difosfato

**GEF:** *Guanine nucleotide exchange factors*. Factores de intercambio de nucleótidos de guanina

**Gfap:** *Glial Fibrillary Acidic Protein*

**GFP:** *Green Fluorescent Protein*. Proteína fluorescente verde

**Grb2:** *Growth factor receptor-bound protein 2*

**Gsk-3 $\beta$ :** *Glycogen synthase kinase 3 beta*.

**GST:** *Glutathione S-transferase*. Glutathion-S-Transferasa

**GTP:** *Guanosine Triphosphate*. Guanosín trifosfato

**H&E:** *Hematoxylin and eosin*. Hematoxilina y eosina

**HEK293T:** *Human Embryonic Kidney 293T*. Células embrionarias de riñón humano 293T.

**HRP:** *Horseradish Peroxidase*. Peroxidasa de rábano

**Il6:** *Interleukin 6*. Interleucina 6

**Ink4:** *Inhibitors of CDK4*. Inhibidores de CDK4

**iPSC:** *induced Pluripotent Stem Cell*. Células madre de pluripotencia inducida

**IPTG:** *Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*. Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido

**IRES:** *Internal ribosome entry site*. Sitio interno de entrada al ribosoma

**i4F:** *inducible four factor*. Cuatro factores inducibles

**Kdm2b:** *Lysine Demethylase 2B*

**KI:** *Knock-in*

**Klf4:** *Kruppel-like factor 4*

**KO:** *Knock-out*

**KSR:** *KnockOut Serum Replacement*

**LB:** *Luria-Broth*

**LIF:** *Leukemia Inhibitory Factor*. Factor inhibidor de la leucemia

**lncRNA:** *long non-coding RNA*. ARN largos no codificantes

**MAPK:** *Mitogen-Activated Protein Kinase*. Proteínas quinasas activadas por mitógenos

**3-MCA:** *Methylcholanthrene*. 3-metilcolantreno

**MDM2:** *Mouse Double Minute 2*

**MDM4:** *Mouse Double Minute 4*

**MEFs:** *Mouse Embryonic Fibroblasts*. Fibroblastos embrionarios de ratón

**Mek:** *MAP kinase kinase*

**mRNA:** *messenger RNA*. ARN mensajero

**mTOR:** *mammalian target of rapamycin*

**NEAA:** *Non-essential aminoacids*. Aminoácidos no esenciales

**NFκB:** *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

**Nf1:** *Neurofibromin 1*

**Nkx2.5:** *NK2 Homeobox 5*

**Nr5a2:** *Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 2*

**Oct4:** *Octamer-binding transcription factor 4*

**OIS:** *Oncogene-induced senescence*. Senescencia inducida por oncogenes

**ON:** *overnight*

**PanIN:** *Pancreatic Intraepithelial Neoplasia*. Neoplasia intraepitelial pancreática

**PBS:** *Phosphate Buffered Saline*. Tampón fosfato salino

**PCR:** *Polymerase Chain Reaction*. Reacción en cadena de la polimerasa

**PEI:** *Polyethylenimine*. Polietilenimina

**PIP<sub>2</sub>:** *Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*. Fosfatidilinositol (3,4)-bifosfato

**PIP<sub>3</sub>:** *Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato

**PI3K:** *Phosphatidylinositol-3-kinases*. Fosfatidilinositol-3-quinasa

**Pkb:** *Protein Kinase B*. Proteína quinasa B

## ABREVIATURAS

**PLC $\epsilon$** : *Phospholipase C Epsilon*. Fosfolipasa C Epsilon  
**Pparg**: *Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma*  
**PVDF**: *Polyvinylidene fluoride*. Fluoruro de polivinilideno  
**qRT-PCR**: *Quantitative Real Time PCR*. PCR cuantitativa a tiempo real  
**Raf**: *Rapidly Accelerated Fibrosarcoma*  
**RalGDS**: *Ral Guanine nucleotide dissociation stimulator*. Estimulador de disociación de nucleótidos de guanina de Ral  
**Ras**: *Rat sarcoma*. Sarcoma de rata  
**Rb**: *Retinoblastoma*  
**RBD**: *Ras Binding Domain*. Dominio de unión a Ras  
**RIPA**: *Radio-Immune Precipitation Assay*. Tampón de ensayo de inmunoprecipitación  
**RNA**: *Ribonucleic acid*. Ácido ribonucleico  
**RT**: *room temperature*. Temperatura ambiente  
**rtTA**: *reverse tetracycline-controlled transactivator*. Transactivador reverso dependiente de tetraciclina  
**SA- $\beta$ -Gal**: *Senescence Associated  $\beta$ -galactosidase*.  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia  
**SASP**: *Senescence Associated Secretory Phenotype*. Fenotipo secretor asociado a senescencia  
**SCNT**: *Somatic Cell Nuclear Transfer*. Transferencia nuclear de células somáticas  
**SDS**: *Sodium dodecyl sulfate*. Dodecilsulfato sódico  
**SOS1**: *son of sevenless 1*  
**SOS2**: *son of sevenless 2*  
**Sox2**: *sex determining region Y-box 2*  
**SPF**: *Specific Pathogen Free*. Libre de patógenos específicos  
**Ssea1**: *Stage-specific embryonic antigen 1*  
**TA**: *tibialis anterior*  
**TEMED**: *Tetramethylethylenediamine*. Tetrametiletilendiamina  
**TetOP**: *Tetracycline-Controlled Promoter*. Promotor controlado por tetraciclina  
**Tg**: *Transgenic*. Transgénico  
**Thy1**: *Thy-1 cell surface antigen*  
**TIAM1**: *T-Cell Lymphoma Invasion And Metastasis 1*

**TPA:** *12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate.* 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

**WB:** *Western blot*

**Wt:** *Wild type.* Tipo salvaje

**X-Gal:** *5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactoside.* 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido





# **INTRODUCCIÓN**





### 1. IDENTIDAD CELULAR Y PLASTICIDAD

Durante el desarrollo embrionario se genera un organismo completo a partir de una única célula, el cigoto. La complejidad celular presente en un organismo adulto, se estima que contiene unos 200 tipos celulares especializados distintos, es posible gracias a la existencia de células madre con la capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse dando lugar a distintos tipos celulares especializados.

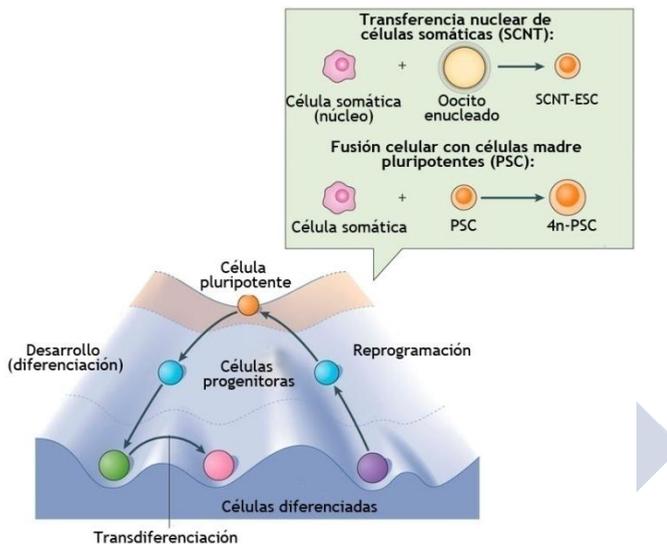
La autorrenovación y la pluripotencia son por tanto características clave de las células madre. La autorrenovación les permite dividirse de manera ilimitada mediante la producción de células hijas con propiedades idénticas a las de la célula progenitora. Por su parte, la pluripotencia es la capacidad de diferenciarse dando lugar a distintos tipos celulares especializados. Ambas características juegan un papel fundamental durante el desarrollo embrionario, así como para el mantenimiento de los tejidos en el organismo adulto.

Las células madre se clasifican en función de su capacidad de diferenciación. El cigoto y los blastómeros son células totipotentes, lo que significa que pueden dar lugar a todas las células del embrión y del tejido extraembrionario. El siguiente estadio en el desarrollo embrionario es el de las células pluripotentes, las células madre embrionarias (ESC, *Embryonic Stem Cells*). Estas células pueden dar lugar a todos los tipos celulares que conforman el organismo; pero no son capaces de originar tejidos extraembrionarios. A medida que avanzamos en el desarrollo las células van perdiendo potencial. Las células multipotentes, como las células madre hematoyéticas, pueden originar los distintos tipos especializados dentro de un único tejido. Las células oligopotentes, como las células madre mieloides o linfoides, solo dan lugar a unos pocos tipos celulares distintos. Y por último las células unipotentes, células progenitoras presentes en los organismos adultos y que se pueden diferenciar a un único tipo celular, como las células madre musculares (De Los Angeles et al., 2015).

Estos distintos tipos de células madre, así como las células somáticas diferenciadas, se originan a lo largo del desarrollo mediante la adquisición de marcas epigenéticas que condicionarán su perfil de

## INTRODUCCIÓN

expresión y por lo tanto, su destino. Waddington representó este proceso con la metáfora de la ladera epigenética (Waddington C. H., 1957). Un paisaje descendente y con bifurcaciones que la célula tendrá que recorrer hasta alcanzar el estadio final diferenciado. A medida que avanza el desarrollo, cada célula adquiere unas marcas epigenéticas determinadas en función de la trayectoria que siga. Este perfil epigenético condicionará su destino final formando parte de un linaje concreto.



**Figura 1.** Durante el desarrollo embrionario las células pluripotentes dan lugar a distintos tipos de células diferenciadas mediante la adquisición de marcas epigenéticas. Este proceso fue representado como una ladera epigenética (Waddington C. H., 1957) que la célula recorre en sentido descendente. En la figura se muestran los procesos por los cuales puede alterarse el estado diferenciado: transdiferenciación entre distintos tipos celulares diferenciados, o reprogramación hacia el estado indiferenciado. En el recuadro se representan los procesos de SCNT y fusión celular. (Imagen adaptada de Takahashi and Yamanaka, 2016. Con permiso de Springer Nature).

Inicialmente se consideraba que este proceso era irreversible y que una vez alcanzado el estadio final diferenciado, las células permanecían inalterables. Sin embargo, hoy en día se sabe que esta identidad celular establecida puede alterarse en mayor o menor medida gracias a la plasticidad celular. La plasticidad celular permite que una célula adquiera características distintas a las iniciales en

respuesta a determinadas condiciones. Esta plasticidad tiene una gran importancia biológica durante procesos fisiológicos como el desarrollo o la regeneración. No obstante, puede conducir también al establecimiento de linajes aberrantes, como ocurre en la transformación oncogénica. La investigación en este campo ha permitido el desarrollo de estrategias que nos permiten modular esta plasticidad celular, produciendo cambios controlados y dirigidos en la identidad celular, como son los procesos de transdiferenciación o la reprogramación celular (**Figura 1**).

## **2. REPROGRAMACIÓN CELULAR**

### **2.1. Inicios de la reprogramación celular**

La reprogramación nuclear mediante transferencia nuclear o expresión ectópica de factores definidos ha logrado revertir el estado final diferenciado de las células somáticas hasta totipotencia o pluripotencia respectivamente (Gurdon, 1962; Takahashi and Yamanaka, 2006) lo que supuso un hito en el campo de la biología del desarrollo.

La primera evidencia de que una célula diferenciada puede volverse de nuevo pluripotente deriva de los experimentos de transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, *Somatic Cell Nuclear Transfer*) de John Gurdon en *Xenopus* (Gurdon, 1962). La transferencia del núcleo de una célula somática a un oocito desprovisto de su núcleo, logra dar lugar a un organismo completo idéntico genéticamente al donante de la célula somática. En 1997, esta misma estrategia fue empleada para la clonación de mamíferos, dando lugar a la oveja Dolly (Wilmut et al., 1997).

Posteriormente, se descubrió que la reprogramación nuclear se puede producir mediante la fusión de dos tipos de células distintas. La fusión de una célula diferenciada con un tipo celular diferente consigue modificar el patrón de expresión la célula (Blau et al., 1983). Basándose en este proceso, se logró que células somáticas expresasen genes propios del estado pluripotente tras la fusión de estas con células madre embrionarias (Tada et al., 1997).

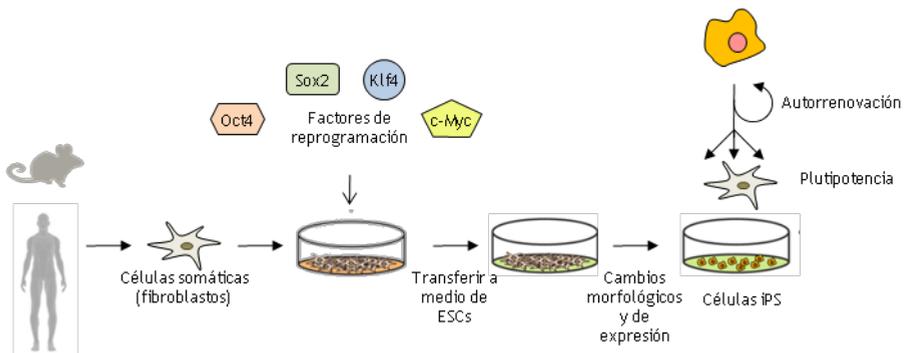
## INTRODUCCIÓN

Estos experimentos de SCNT y fusión celular demuestran que una célula somática conserva en su genoma toda la información necesaria para generar un organismo completo. Durante el desarrollo se va especializando, pero mediante la introducción en un ambiente adecuado logra recobrar todo el potencial inicial. Estas observaciones apuntan a la existencia de factores presentes en células pluripotentes que son capaces de reprogramar el núcleo somático.

### 2.2. Reprogramación celular a iPSC

En el año 2006, Takahashi y Yamanaka lograron identificar cuatro factores de transcripción que al ser expresados en una célula somática logran reprogramarla hasta la pluripotencia, generando las denominadas células madre de pluripotencia inducida (iPSC, *induced Pluripotent Stem Cell*) (Takahashi and Yamanaka, 2006). Estas células adquieren las características de las células ES, autorrenovación y pluripotencia.

Comenzaron seleccionando genes cuya expresión estaba enriquecida en células ES en relación a células somáticas y con implicación en vías celulares fundamentales para la pluripotencia. Obtuvieron así un listado de 24 genes candidatos para el establecimiento de la pluripotencia. Para realizar el cribado emplearon fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, *Mouse Embryonic Fibroblasts*) transgénicos que expresan el gen  $\beta$ -galactosidasa y el gen de resistencia a neomicina, bajo el control de promotor del gen *Fbxo15*, identificado previamente como específico de ES (Tokuzawa et al., 2003). La introducción de los 24 genes en estos MEFs originó la aparición de colonias resistentes a G418 y con características propias de las células ES. Empleando este sistema de cribado fueron reduciendo el número inicial de genes necesarios para el establecimiento de la pluripotencia hasta quedarse con solo cuatro factores: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc* (Takahashi and Yamanaka, 2006) (**Figura 2**).



**Figura 2. Reprogramación de células somáticas hacia iPS mediante la expresión ectópica de los factores de reprogramación.** La expresión de los factores: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*, restaura el perfil epigenético y transcripcional de células especializadas y las revierte hasta el estado embrionario, caracterizado por la capacidad de autorrenovación y pluripotencia. (Imagen adaptada de Rony et al., 2015. Con permiso de John Wiley and Sons).

Aunque inicialmente la reprogramación celular se describió en fibroblastos embrionarios y adultos de ratón (Takahashi and Yamanaka, 2006), un año más tarde se logró la reprogramación de fibroblastos humanos empleando la misma combinación de factores (Park et al., 2008; Takahashi et al., 2007) o modificando dos de los factores empleados: *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin28* (Yu et al., 2007). Desde su descubrimiento hasta la actualidad, el número de tipos celulares que han logrado reprogramarse ha aumentado exponencialmente.

La obtención de células iPS es un proceso con una baja eficiencia, menos de un 1% de los fibroblastos logran reprogramarse completamente. Esto es debido a que se trata de un proceso estocástico que requiere de la combinación de distintos eventos (Hanna et al., 2009). La expresión de los factores de transcripción tiene que provocar el silenciamiento de los genes propios del estado diferenciado y la expresión de los genes de pluripotencia endógenos (Polo et al., 2012). Además, la célula presenta una serie de barreras, de las que hablaremos más adelante, que actúan como mecanismo de protección frente a este cambio de identidad.

El descubrimiento de esta técnica supuso un importante avance en la medicina regenerativa. La posibilidad de generar células

pluripotentes a partir de células somáticas, elimina los problemas éticos asociados al trabajo con células embrionarias. Además, permite la realización de trasplantes autólogos, evitando así las probabilidades de rechazo. Todo esto hizo que se necesitase perfeccionar la tecnología para hacer el proceso lo más seguro posible con el objetivo de su posible uso en la práctica clínica.

Uno de los factores inicialmente empleados para inducir la reprogramación, *c-Myc*, es un importante oncogén frecuentemente amplificado en tumores humanos, lo que podría acarrear problemas relacionados con su empleo en la clínica. Posteriormente se observó que este factor era prescindible y se podían generar iPSC sin incluir este oncogén en el coctel de reprogramación (Nakagawa et al., 2008).

### **2.3. Sistemas alternativos**

Otro de los aspectos a tener en cuenta es el sistema empleado para expresar los factores de reprogramación en las células somáticas. El primer método empleado fue el uso de vectores retrovirales para cada factor por separado. Se trata de vectores virales que se integran en el genoma y tras la reprogramación se silencian. Sin embargo, presentan el riesgo de alterar la expresión de genes próximos a la zona de integración o de reexpresarse tras la diferenciación. Para tratar de subsanar este problema se desarrollaron nuevos sistemas para la introducción de los factores, como vectores episomales (Yu et al., 2009), virus Sendai (Fusaki et al., 2009; Nishimura et al., 2011) o mRNAs sintéticos (Warren et al., 2010), que evitan la integración en el genoma, lo que constituye un método más seguro. En el año 2013 se logró la obtención de iPSC mediante la combinación de pequeños compuestos químicos que logran el remodelado epigenético sin necesidad de introducir ningún elemento genético exógeno (Hou et al., 2013). Recientemente se han logrado reprogramar células con un sistema basado en la tecnología CRISPR que produce el remodelado de cromatina en los loci *Oct4* y *Sox2* endógenos (Liu et al., 2018).

Además de estos métodos para la introducción de los factores, se generaron modelos animales transgénicos que expresan los cuatro factores de reprogramación OSKM de manera inducible (Abad et al., 2013; Carey et al., 2009). Estos ratones transgénicos presentan un

casete policistrónico que codifica para los factores OSKM bajo el control de un promotor dependiente de tetraciclina. Además presentan también el transactivador reverso dependiente de tetraciclina (rtTA) de modo que, en presencia del inductor, doxiciclina, permite la expresión de los factores en las células derivadas de este ratón.

#### **2.4. Reprogramación *in vivo***

En el año 2013, uno de estos ratones reprogramables permitió demostrar que la reprogramación celular puede ocurrir *in vivo* (Abad et al., 2013). Este descubrimiento supuso un importante avance ya que implica que la plasticidad celular en los tejidos es mayor de lo que se pensaba, y se puede lograr un cambio de identidad hacia pluripotencia.

La administración de doxiciclina en el agua de bebida del ratón reprogramable consigue inducir la expresión de los factores OSKM en los distintos tejidos del animal. Como resultado de esta expresión se producen procesos de desdiferenciación y reprogramación en diferentes tejidos. Esta reprogramación resulta en la formación de teratomas emergiendo de distintos órganos así como en la aparición de grupos de células desdiferenciadas expresando Nanog en tejidos como estómago, intestino, páncreas e hígado.

Aunque el análisis de expresión indica que los factores se expresan en la gran mayoría de tejidos, no todos son capaces de reprogramarse, lo que parece indicar que existen tejidos más permisivos que otros frente a esta desdiferenciación.

Otro de los puntos clave de este trabajo es que se consigue aislar células iPSC de la sangre de estos ratones y el análisis de estas indica que van un paso más allá en la desdiferenciación que con la reprogramación *in vitro*, ya que estas células son totipotentes y dan lugar a células propias de la placenta tras la diferenciación (Abad et al., 2013).

La expresión de los factores en estos ratones, sin llegar a permitir la reprogramación completa, genera un estado desdiferenciado que puede favorecer la regeneración, lo que resulta muy atractivo para el campo de la medicina regenerativa. De hecho, un trabajo posterior con un modelo de ratón similar, muestra como la administración de pulsos

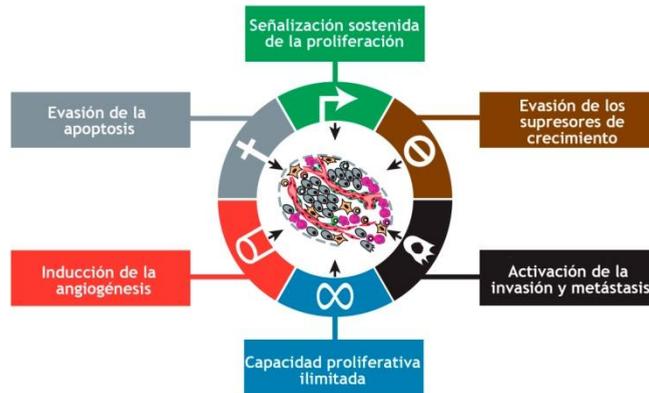
cíclicos de doxiciclina en estos ratones, provocando la expresión de los factores OSKM pero sin llegar a inducir reprogramación, tiene efectos beneficiosos, mejorando aspectos relacionados con el envejecimiento. Esta posibilidad se ha probado en un modelo de envejecimiento prematuro, el síndrome de progeria Hutchinson-Gilford, y en ratones wt (*wild type*) envejecidos fisiológicamente. En estos ratones se logra la mejora en aspectos relacionados con el envejecimiento celular y fisiológico, así como un aumento de la esperanza de vida (Ocampo et al., 2016).

Sin embargo, la expresión de los factores OSKM en otro modelo similar de ratón reprogramable, en el que se produce una terminación prematura del proceso de reprogramación, conduce a la formación de tumores (Ohnishi et al., 2014). Esto pone de manifiesto una estrecha relación entre los procesos de reprogramación y transformación y hace necesario profundizar en la relación entre estas vías con el fin de desarrollar estrategias seguras para sus posibles aplicaciones terapéuticas.

### **3. CÁNCER**

#### **3.1. Características del cáncer**

El cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas en las que algunas células del organismo comienzan a dividirse de forma incontrolada e invaden tejidos adyacentes. Este crecimiento anómalo es el resultado de la acumulación de alteraciones genéticas, epigenéticas y transcripcionales que provocan un cambio en la identidad celular. Las características que definen a las células tumorales fueron enumeradas en una revisión clásica en el año 2000 por Hanahan y Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000). Estas serían la señalización sostenida de la proliferación, la evasión de los supresores de crecimiento, la evasión de la apoptosis, la capacidad proliferativa ilimitada, la angiogénesis y la capacidad invasiva y metastásica (**Figura 3**).



**Figura 3. Características del cáncer.** En la figura se enumeran las seis características del cáncer descritas inicialmente por Hanahan y Weinberg. (Imagen adaptada de Hanahan and Weinberg, 2011. Con permiso de Elsevier).

En el año 2011, se publicó una actualización de estas características y de los avances producidos en el campo, en la que se incluyeron dos nuevas características: el cambio metabólico en las células tumorales hacia un metabolismo glucolítico y la evasión del sistema inmune (Hanahan and Weinberg, 2011).

Todas estas características derivan de la inestabilidad genómica que presentan las células tumorales. Las células normales presentan unas tasas de mutación bajas, que junto con los mecanismos de control de la integridad celular y la capacidad proliferativa limitada harían el proceso de transformación muy poco frecuente. En las células tumorales, debido a esta inestabilidad genómica, se producen múltiples mutaciones aleatorias, algunas de las cuales dan lugar a la adquisición de estas características.

El ciclo celular está estrechamente controlado por una cascada de reguladores que tienen como finalidad mantener el correcto funcionamiento de la célula. Para que una célula se transforme se requiere la alteración de estos mecanismos de control, ya sea mediante la mutación de oncogenes, favoreciendo la proliferación; o de genes supresores de tumores, de modo que se inhibe la regulación negativa del ciclo celular.

### 3.2. Oncogenes: la familia Ras

Los oncogenes actúan regulando positivamente el ciclo celular. La mutación en estos genes conduce a la proliferación incontrolada y contribuye a la inestabilidad genómica de las células tumorales. El primer oncogén aislado de un tumor humano fue Ras, y a partir de su descubrimiento se encontró que es uno de los oncogenes más frecuentemente mutados en tumores humanos.

El oncogén Ras fue inicialmente descrito en la década de los 60/70 en el genoma de los retrovirus oncogénicos *Harvey sarcoma* y *Kirsten sarcoma*. Estos virus provocaban la formación de sarcomas en los roedores infectados e inducían la transformación de células NIH/3T3 *in vitro*. Su nombre se debe a que se aislaron inicialmente a partir de sarcomas de rata (**rat sarcoma**, Ras) (Barbacid, 1987).

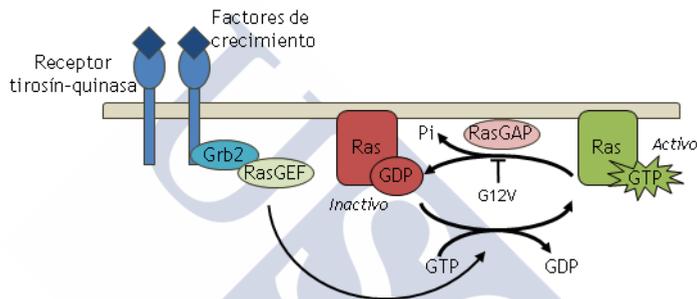
En el año 1982, tres grupos, de manera independiente, identificaron este oncogén en la línea celular humana de carcinoma de vejiga urinaria EJ/T24 (Der et al., 1982; Parada et al., 1982; Santos et al., 1982).

Se trata de una familia formada por 3 genes con una elevada homología: *Hras*, *Kras* y *Nras*. Estos tres genes tienen funciones similares aunque presentan ciertas características diferenciales (Malumbres and Barbacid, 2003; Pylayeva-Gupta et al., 2011). Se expresan a distintos niveles en los diferentes tejidos y desempeñan papeles diferentes durante el desarrollo embrionario. Mientras que *Hras* y *Nras* son prescindibles en el desarrollo embrionario, la falta de *Kras* en modelos animales es letal embrionaria (Malumbres and Barbacid, 2003).

Las proteínas codificadas por estos genes son pequeñas proteínas de 21kDa con actividad GTPasa ubicadas en la cara interna de la membrana plasmática (Barbacid, 1987). Se trata de interruptores moleculares, que en respuesta a señales extracelulares desencadenan la activación de múltiples vías de señalización intracelular implicadas en diversas funciones: proliferación, expresión génica, supervivencia, diferenciación, migración, integridad del citoesqueleto, etc.

### 3.2.1. Regulación de las proteínas Ras

Las proteínas Ras alternan entre sus dos posibles conformaciones: activa, cuando se encuentran unidas a GTP; o inactiva, cuando están unidas a GDP. La transición entre estos dos estados está mediada por factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs, *Guanine nucleotide Exchange Factors*) que promueven la activación de Ras mediante el cambio de GDP por GTP y por proteínas activadoras de GTPasa (GAPs, *GTPase-Activating Proteins*) que promueven la hidrólisis de GTP por Ras (**Figura 4**).



**Figura 4. Regulación de Ras.** Los factores de crecimiento extracelulares interactúan con los receptores transmembrana tirosín-quinasa. Mediante la proteína adaptadora Grb2, esta señal se transmite a los RasGEF que activan Ras, al intercambiar GDP por GTP. La inactivación de Ras está mediada por los RasGAP, que hidrolizan el GTP a GDP. La mutación oncogénica G12V de Ras impide la interacción con los RasGAP, por lo que Ras permanece en estado activo unido a GTP.

El primer GAP identificado fue la proteína p120. Se identificó en el año 1988 (Trahey et al., 1988; Vogel et al., 1988) como un factor citosólico responsable de la alta tasa de hidrólisis de GTP cuando se expresa Ras wt respecto a la versión oncogénica. Unos años más tarde se identificó a Nf1 (Neurofibromina) (Ballester et al., 1990; Martin et al., 1990; Wallace et al., 1990; Xu et al., 1990), el gen responsable de la neurofibromatosis, como otro GAP implicado en la vía de Ras.

Los RasGEF de mamíferos, fundamentalmente SOS1, SOS2 y RasGRF, fueron aislados por primera vez en 1992 basándose en la homología de secuencia y función con CDC25 (Bowtell et al., 1992; Martegani et al., 1992; Shou et al., 1992; Wei et al., 1992), el

## INTRODUCCIÓN

regulador por encima de Ras identificado previamente en levaduras (Broek et al., 1987; Robinson et al., 1987).

Tras identificar los reguladores de la activación de Ras, quedaba por definir cómo se integraba la señal extracelular recibida por el receptor tirosín-quinasa con los RasGEF. Un año más tarde se identificaron las moléculas que funcionan como adaptadores para lograr esta integración (McCormick, 1993). La proteína Grb2 presenta varios dominios SH de interacción entre proteínas a través de regiones ricas en prolina. Mediante su único dominio SH2, interacciona con el receptor transmembrana, mientras que a través del otro extremo interacciona con SOS a través de un dominio SH3.

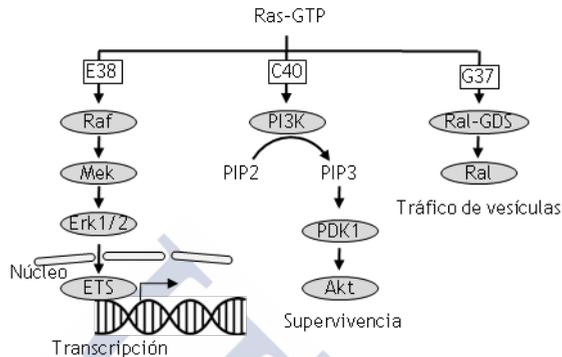
### 3.2.2. *Ras en cáncer*

Los miembros de la familia Ras son los oncogenes más frecuentemente mutados en cáncer, siendo *Kras* el más común, seguido de *Hras* y *Nras*. Cada uno de ellos está asociado a ciertos tipos de tumores: *Kras* se encuentra mutado en cáncer de pulmón de células no pequeñas, colon y carcinomas pancreáticos; *Hras* está asociado a tumores de la piel, cabeza y cuello; y las mutaciones en *Nras* son comunes en tumores hematológicos (Pylayeva-Gupta et al., 2011).

Las mutaciones más frecuentes en estas proteínas se dan en las posiciones Q61, G12 o G13. La forma *wild type* (wt) posee en la posición aminoacídica 61 una glutamina (Q61) con actividad catalítica en el lugar de unión a GTP, cuya mutación impide la hidrólisis de GTP. Por su parte, el cambio de una glicina por otro aminoácido en posición 12 o 13 supone la incorporación de una cadena lateral que impide la correcta conformación espacial para que interaccione con las GAPs y se produzca la hidrólisis de GTP. Por tanto, las mutaciones en Q61, G12 o G13 tienen como consecuencia el impedimento de la hidrólisis de GTP ya sea mediada por la inactivación de la propia actividad catalítica de Ras o por la pérdida de interacción con las GAPs (Gibbs et al., 1984; McGrath et al., 1984; Sweet et al., 1984). En consecuencia, Ras permanece unido a GTP y por lo tanto en estado activo de forma constitutiva, desencadenando su actividad oncogénica.

### 3.2.3. Vías de señalización intracelular

Los principales efectores por debajo de Ras en las vías de señalización intracelular son Raf, PI3K y RalGDS (**Figura 5**).



**Figura 5. Vías de señalización activadas por Ras.** Representación esquemática de las principales vías de señalización activadas por Ras: MAPK/ERK, PI3K y RalGDS, mostrando las mutaciones específicas de Ras que conducen a la activación preferencial de cada una de estas vías (E38, C40, G37). Se indican las principales funciones, además del control del ciclo celular, en las que están implicadas.

- Vía MAPK/ERK

El primer efector directo de Ras descubierto fue Raf (Moodie et al., 1993; Vojtek et al., 1993; Warne et al., 1993; Zhang et al., 1993). Se trata de otro oncogén inicialmente identificado en retrovirus transformantes murinos y aviares. Al igual que Ras, se trata de una familia compuesta por tres miembros con una elevada homología: *Araf*, *Braf* y *Craf*.

Estas proteínas son serín-treonín quinazas que interaccionan directamente con Ras cuando se encuentra en estado activo, unido a GTP. Esta interacción provoca su activación, que desencadena a su vez la activación secuencial de la vía de las proteínas quinazas activadas por mitógenos (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*). Raf fosforila a MeK y esta, a su vez, fosforila a Erk1/2 (*Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2*), una serín-treonín quinasa capaz de translocarse al núcleo, donde mediante la activación de factores de transcripción de la familia ETS es capaz de modular la expresión génica (Leever and Marshall, 1992; Wood et al., 1992).

## INTRODUCCIÓN

Con el descubrimiento de esta vía se logró comprender cómo señales mitóticas procedentes del exterior de la célula pueden alcanzar el núcleo celular para ejercer su efecto sobre la expresión génica, y cómo este proceso puede estar alterado en células tumorales.

La identificación de mutaciones oncogénicas en Raf, independientes de las mutaciones en Ras, en tumores de tipo melanoma o cáncer de colon, refuerza la importancia de esta vía en el proceso de transformación oncogénica (Davies et al., 2002).

- Vía PI3K

En el año 1991 se publicó por primera vez la asociación de la actividad de la fosfoinositol-3-quinasa (PI3K) con Ras (Sjölander et al., 1991). Sin embargo, no fue hasta tres años más tarde cuando se identificó a la PI3K como un efector directo de Ras (Rodríguez-Viciana et al., 1994).

Ras interacciona con las subunidades catalíticas p110 de la PI3K desencadenando su activación. La conversión del fosfatidilinositol (3,4)-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) a fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP<sub>3</sub>) por PI3K conduce a la activación de la serín/treonín quinasa Akt/Pkb. A través de sus múltiples efectores, Akt lleva a cabo distintas funciones en las células. Entre ellas, inhibe la apoptosis y favorece la supervivencia celular mediante la regulación de los miembros de la familia Bcl-2 y activando vías de supervivencia como NFκB (Downward, 1998). Además, promueve el crecimiento celular a través de la activación de mTOR y estimula la progresión del ciclo celular al regular negativamente los supresores tumorales de la familia Cip/Kip (Manning and Cantley, 2007).

- Vía RalGDS

Otro de los efectores directos de Ras es el estimulador de disociación de nucleótidos de guanina de Ral (RalGDS), identificado en 1994 (Hofer et al., 1994; Kikuchi et al., 1994; Spaargaren and Bischoff, 1994) y del que existen dos isoformas, RalA y RalB. Se trata de GTPasas altamente similares con implicaciones en proliferación y supervivencia (Chien and White, 2003). Las dos vías anteriores son las principales efectoras de la activación de Ras en células tumorales.

Sin embargo, esta vía, aunque menos estudiada, tiene implicaciones también en la tumorigénesis.

El desarrollo de vectores de Ras oncogénico con mutaciones puntuales que activan de manera preferencial solo una de las vías canónicas por debajo de Ras, permite analizar la contribución de cada una de estas vías al proceso de transformación. La mutación E38 activa la vía de Raf, la mutación C40 provoca la activación de la vía PI3K, y la mutación G37 activa la vía de RalGDS. El empleo de estos mutantes puso de manifiesto un requerimiento específico de cada una de estas vías para la transformación según el tipo celular y la especie de la que se trate (Rangarajan et al., 2004; Rodríguez-Viciano et al., 1997) (**Figura 5**).

Durante todos estos años de investigación sobre Ras se han ido encontrado nuevas vías que se activan en respuesta a Ras y nuevos efectores directos como PLC $\epsilon$  (Kelley et al., 2001), implicada en señalización por segundos mensajeros, o TIAM1, con posibles efectos opuestos en iniciación, mantenimiento y progresión de tumores dependientes de Ras, como los inducidos por el tratamiento con DMBA (Lambert et al., 2002).

### ***3.2.4. Funciones de Ras***

Las múltiples vías de señalización activadas por Ras en la célula ejercen su efecto sobre diversas funciones. Las funciones más importantes relacionadas con el cáncer son:

- Proliferación

La activación de Ras en las células promueve la proliferación. Este efecto está mediado por el aumento de la ciclina D1 (Filmus et al., 1994) y la reducción de los supresores tumorales p27 y p21 (Aktas et al., 1997; Kerkhoff and Rapp, 1998). La hiperproliferación inducida por Ras conduce a la acumulación de daño en el DNA lo que desencadena respuestas frente a daño y, si la maquinaria celular de supresión tumoral está en correcto funcionamiento, se induce la entrada en senescencia inducida por oncogenes (Serrano et al., 1997).

## INTRODUCCIÓN

- Supervivencia

La activación de Ras en la célula regula negativamente genes pro-apoptóticos y activa genes anti-apoptóticos, favoreciendo con ello la supervivencia celular, de manera mediada principalmente por la vía de la PI3K. En algunos contextos Ras puede actuar promoviendo la apoptosis. Sin embargo, en un contexto tumoral las señales pro-supervivencia tienen un papel dominante (Cox and Der, 2003).

Además, Ras tiene otras muchas funciones importantes en cáncer como: la reprogramación metabólica hacia la vía glucolítica, favorece la angiogénesis, interviene en el remodelado de la matriz extracelular mediante la secreción de metaloproteasas, favorece la metástasis, etc. Debido a la multitud de funciones de Ras, el contexto celular en cada caso determinará cuál de ellas prevalece (Pylayeva-Gupta et al., 2011).

### 3.3. Mecanismos supresores de tumores

Las células cuentan con mecanismos que se oponen a la transformación oncogénica. Los supresores de tumores son reguladores negativos del ciclo celular que se encargan de controlar su progresión y de detenerlo cuando las condiciones no son adecuadas.

Entre los supresores tumorales más importantes, destacan: los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (Cdks, *Cyclin Dependent Kinases*): p15, p16, p18, p19, p21, p27, p57; la familia de retinoblastoma: p107, p130, pRb; y el guardián del genoma, p53.

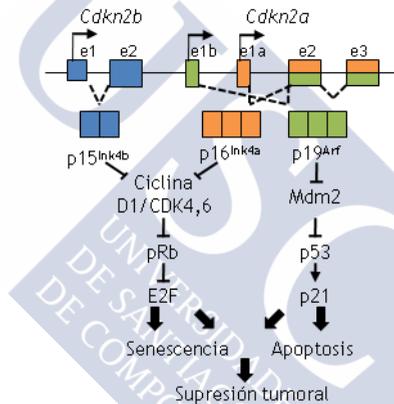
#### 3.3.1. Inhibidores de Cdks

La progresión del ciclo celular desde G1 hacia la fase S de síntesis de DNA está estrechamente controlada por una cascada de reguladores. Esta transición G1/S está controlada por quinasas dependientes de ciclinas (Cdk) que a su vez están reguladas por sus inhibidores. Estos inhibidores pertenecen a dos familias distintas en función de su estructura y de los complejos ciclina/Cdk que regulan: la familia Ink4, compuesta por las proteínas p16<sup>Ink4a</sup>, p15<sup>Ink4b</sup>, p18<sup>Ink4c</sup> y p19<sup>Arf</sup>; y la familia Cip/Kip, compuesta por p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p57<sup>Kip2</sup> (Sherr and Roberts, 1999).

- Familia Ink4

Los miembros de la familia Ink4 unen e inhiben a Cdk4 y Cdk6 impidiendo con ello la progresión del ciclo celular desde la fase G1 a la fase S.

El locus Ink4/Arf se encuentra ubicado en el cromosoma 9 y está compuesto por los genes *Cdkn2a* y *Cdkn2b* que codifican para tres potentes supresores tumorales. Dos de ellos pertenecen a la familia Ink4: p16<sup>Ink4a</sup> (*Cdkn2a*) y p15<sup>Ink4b</sup> (*Cdkn2b*). El tercero, p19<sup>Arf</sup>, que comparte secuencia genómica con *Cdkn2a* pero cuyo producto proteico se genera en una fase de lectura alternativa, es un regulador negativo de p53 (**Figura 6**).



**Figura 6. Supresores tumorales.** Representación del locus Ink4/Arf formado por los genes *Cdkn2b* y *Cdkn2a* que codifican para los supresores tumorales p15<sup>Ink4b</sup>, p16<sup>Ink4a</sup> y p19<sup>Arf</sup>. Representación de la regulación que ejercen sobre las vías de pRb y p53 desencadenando la entrada en senescencia o apoptosis como mecanismos de supresión tumoral.

Estos supresores tumorales pueden no expresarse, como p16<sup>Ink4a</sup>, o hacerlo a niveles basales en las células diferenciadas y, en respuesta a señales mitóticas aberrantes, se regulan positivamente activando vías antiproliferativas que conducen a la parada del ciclo celular o a la apoptosis (Kim and Sharpless, 2006). Los inhibidores del ciclo p16<sup>Ink4a</sup> y p15<sup>Ink4b</sup> actúan sobre la vía de Rb, mientras que p19<sup>Arf</sup> lo hace a través de p53.

## INTRODUCCIÓN

En los tumores humanos el evento genético más frecuente en esta región genómica es la delección completa del locus Ink4/Arf, que elimina la expresión de las tres proteínas: p15<sup>Ink4b</sup>, p16<sup>Ink4a</sup> y p19<sup>Arf</sup>, o la delección del gen *Cdkn2a* afectando a p16<sup>Ink4a</sup> y a p19<sup>Arf</sup>. Otro de los eventos frecuentes es el silenciamiento por hipermetilación de secuencias reguladoras comunes de p16<sup>Ink4a</sup> y p19<sup>Arf</sup> (Sherr, 2012). El desarrollo de modelos animales transgénicos para estos supresores tumorales sirvió para demostrar la implicación de cada uno de ellos en cáncer. Los modelos de ratones deficientes para cada uno de estos supresores tumorales por separado presentan una alta predisposición al desarrollo de tumores. Sin embargo, la incidencia es mayor cuando carecen de p16<sup>Ink4a</sup> y p19<sup>Arf</sup> de modo simultáneo, indicando cierta sinergia (Latres et al., 2000; Sharpless et al., 2004). Del mismo modo que los ratones deficientes para este locus presentan una mayor incidencia de tumores que los ratones wt, se observó que la introducción de una copia extra de este locus mediante un cromosoma bacteriano artificial, generando un ratón “*super-Ink4/Arf*”, disminuye la incidencia de tumores espontáneos e inducidos (Matheu et al., 2004).

La proteína p16<sup>Ink4a</sup> además de participar en un mecanismo supresor de tumores está implicada en envejecimiento, aumentando su expresión con la edad en múltiples tejidos (Krishnamurthy et al., 2004).

### • Familia Cip/Kip

Los miembros de la familia Cip/Kip tienen una especificidad más amplia que la familia Ink4, siendo capaces de inhibir tanto a Cdk4/6 como a Cdk2, y lo hacen uniéndose a los complejos formados por estas Cdks con las ciclinas D (en el caso de Cdk4/6), A, E y B (en el caso de Cdk2). Además, intervienen en otras fases del ciclo y son capaces también de regular otros complejos Ciclina/Cdk (Besson et al., 2008).

Las proteínas p21<sup>Cip1</sup> (*Cdkn1a*), p27<sup>Kip1</sup> (*Cdkn1b*) y p57<sup>Kip2</sup> (*Cdkn1c*) presentan un dominio N-terminal común, responsable de la interacción con las ciclinas y Cdk. Sin embargo, difieren en el resto de su secuencia, lo que permite que presenten funciones y mecanismos

de regulación distintos entre ellas. Estas proteínas participan en otras funciones celulares además de la inhibición del ciclo celular, como apoptosis, control de la transcripción, determinación del destino celular y migración celular.

La proteína p21<sup>Cip</sup> es una importante diana transcripcional de p53 mediando la parada del ciclo celular en respuesta a daño en el DNA (Gartel and Tyner, 1999).

Los CDKi de la familia Cip/Kip están implicados en la regulación de la transcripción. Pueden llevar a cabo esta función de forma indirecta mediante la inhibición de los complejos ciclina/Cdk y regulación de los factores de transcripción E2F mediada por las proteínas de la familia Rb; o de modo directo a través de la interacción directa con factores de transcripción.

Además, los miembros de esta familia participan en la regulación del estado de diferenciación de las células progenitoras. Las proteínas p21<sup>Cip1</sup> y p27<sup>Kip1</sup> están implicadas en la regulación de la transcripción de células madre. La proteína p27<sup>Kip1</sup> ha sido identificada formando parte de un complejo represor de la expresión de Sox2 durante diferenciación (Li et al., 2012).

### **3.3.2. Proteínas *pocket* de la familia de retinoblastoma**

La familia de las proteínas retinoblastoma está formada por tres proteínas *pocket*: pRb, p107 y p130, que actúan como reguladores negativos del ciclo celular. Estas proteínas están reguladas por las quinasas dependientes de ciclinas, Cdk2, Cdk4 y Cdk6. Las proteínas de la familia Rb interaccionan con factores de transcripción de la familia E2F regulando así la expresión génica mediada por estos factores y necesaria para que se produzca la transición G1/S (Weinberg, 1995).

El miembro de esta familia con la actividad supresora de tumores más importante es pRb, que se encuentra mutado en múltiples tumores humanos, mientras que p107 y p130 rara vez están inactivados (Burkhart and Sage, 2008). Además, reforzando su papel como supresor tumoral, los ratones heterocigotos para Rb desarrollan

## INTRODUCCIÓN

espontáneamente tumores hipofisarios y en la tiroides con una incidencia alta.

Las proteínas de esta familia están implicadas también en la regulación del estado de diferenciación de las células madre y progenitoras (Burkhart and Sage, 2008). Del mismo modo que ocurre con p27<sup>Kip1</sup>, los miembros de esta familia participan en el control de la expresión de *Sox2* (Vilas et al., 2015).

### ***3.3.3. El guardián del genoma, p53***

La proteína p53 está considerada el supresor tumoral más importante. Debido a su capacidad de responder a múltiples estímulos para garantizar el correcto funcionamiento de la célula se le conoce como el guardián del genoma (Lane, 1992).

El principal mecanismo de regulación de p53 es a través de su estabilidad. En condiciones basales, p53 se encuentra asociado a sus reguladores negativos MDM2 y MDM4, que lo ubiquitinan, marcándolo para su degradación. En respuesta a diversos tipos de estrés, como daño en el DNA, señales mitóticas aberrantes, hipoxia, estrés oxidativo, agotamiento de nucleótidos o falta de nutrientes, p53 se desplaza de sus reguladores negativos y se permite así su estabilización y activación. Una vez activo, p53 se unirá a secuencias específicas de DNA regulando la expresión génica y desencadenando distintas respuestas antiproliferativas.

Como consecuencia de la activación de p53 se pueden desencadenar distintas respuestas en la célula en función del contexto celular. Puede producirse la parada del ciclo celular en G1, para tratar de subsanar el daño sufrido, o cuando el daño no es subsanable, la entrada en senescencia o apoptosis con el fin de evitar la propagación de potenciales células tumorales (Zilfou and Lowe, 2009).

El importante papel de p53 como supresor tumoral queda de manifiesto al encontrarse inactivado en más de la mitad de los tumores humanos esporádicos. Además, la falta o mutación de p53 resulta en una mayor incidencia de tumores espontáneos, como se observó mediante el empleo de ratones transgénicos p53 KO o en pacientes

con el síndrome de Li-Fraumeni, que heredan un alelo de p53 mutado (Brady and Attardi, 2010).

### **3.4. Senescencia inducida por oncogenes**

Debido a la existencia de estos mecanismos supresores de tumores, la expresión de un oncogén activo en células primarias no es suficiente para inducir su transformación. La activación de estos mecanismos, en respuesta a la señalización oncogénica, conduce a la entrada prematura en senescencia, lo que trata de evitar la proliferación de células potencialmente tumorales (Serrano et al., 1997). Esta respuesta fue inicialmente descrita en células primarias en cultivo. La activación de Ras oncogénico en MEFs provoca una primera etapa mitótica, pero tras un corto periodo de tiempo las células quedan paradas en la fase G1 del ciclo celular, de una manera dependiente, al menos en parte, de p53 y p16<sup>Ink4a</sup>. Estas células sufren la denominada senescencia inducida por oncogén (OIS, *Oncogene-induced senescence*) y son idénticas, para los marcadores analizados, a las que se encuentran paradas por senescencia replicativa (Collado and Serrano, 2010).

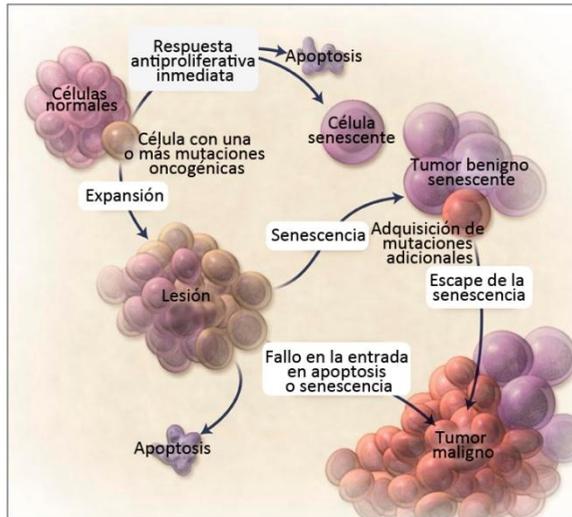
La senescencia celular fue descrita inicialmente por Hayflick en los años 60 (Hayflick, 1965). Hayflick observó que las células primarias tienen una capacidad de proliferación limitada y que tras varios pases en cultivo dejaban de dividirse. Este proceso es conocido como senescencia replicativa y consiste en la parada irreversible del ciclo celular, generalmente en la fase G1.

Sin embargo, hoy en día se sabe que existen otros muchos estímulos que pueden inducir la entrada en senescencia además del agotamiento de la capacidad proliferativa, tratándose de un mecanismo de respuesta a algún tipo de estrés como el daño en el DNA, agentes quimioterapéuticos o la expresión aberrante de oncogenes (Collado et al., 2007).

La entrada prematura en OIS tras la introducción de un oncogén activo en células primarias se describió inicialmente como un mecanismo de defensa antitumoral. Esto pudo confirmarse al encontrar células senescentes asociadas a lesiones premalignas, cuya

## INTRODUCCIÓN

función es tratar de frenar la proliferación incontrolada. La inactivación de genes implicados en esta respuesta conlleva la proliferación sin restricciones, lo que sirve de base para el desarrollo tumoral (**Figura 7**) (Collado et al., 2005).



**Figura 7. Senescencia como mecanismo supresor de tumores.** Tras adquirir una mutación oncogénica, la célula somática puede desencadenar distintos tipos de respuesta. Puede producirse una respuesta antiproliferativa inmediata que conduzca a la entrada en senescencia o a la apoptosis; en ausencia de esta respuesta, la proliferación producida por estas mutaciones origina una lesión. En este punto, pueden activarse o imponerse de nuevo los procesos de apoptosis o senescencia. Si estos mecanismos de defensa no se activan, el crecimiento continuado y la adquisición de nuevas mutaciones oncogénicas conducen al desarrollo de una lesión maligna. Por el contrario, si las células activan la respuesta de senescencia, la lesión puede mantenerse controlada durante largos periodos. En el caso de que estas células logren escapar de la senescencia, se desencadena la transformación hacia lesiones malignas. (Imagen adaptada de Mooi and Peeper, 2006. Con permiso de Massachusetts Medical Society)

El papel de la senescencia en el contexto tumoral ha ido ganando importancia y parece desempeñar funciones opuestas. Por un lado, se trata de un mecanismo protector frente al desarrollo tumoral, al evitar la proliferación de estas células. Sin embargo, estas células senescentes presentan un fenotipo secretor característico, el SASP (*Senescence Associated Secretory Phenotype*), compuesto fundamentalmente por moléculas proinflamatorias, remodeladores de

la matriz extracelular y factores de crecimiento. Los componentes del SASP tienen efectos sobre el microambiente tumoral y generan un contexto proinflamatorio que podría actuar promoviendo el desarrollo del tumor (Coppé et al., 2010).

Además, recientemente se ha demostrado que la senescencia celular confiere a las células tumorales características asociadas a las células madre (Milanovic et al., 2017). Milanovic et al. muestran en este trabajo cómo células que han entrado en senescencia como consecuencia del tratamiento con agentes quimioterapéuticos adquieren características relacionadas con las de las células madre. Si estas células logran escapar de la senescencia y volver a entrar en el ciclo celular, estas nuevas características favorecerán el desarrollo tumoral.

### **3.5. Cooperación oncogénica**

Como acabamos de mencionar, la célula cuenta con numerosos mecanismos de defensa para tratar de mantener intacta su identidad celular ante ciertos daños y estímulos aberrantes. Debido a esto, para lograr la transformación oncogénica completa se requieren al menos dos oncogenes cooperantes que se complementen en sus funciones. Uno de ellos debe inducir la inmortalización de las células, mientras que el otro completará el proceso mediante la transformación de las células, de modo que adquieran un fenotipo oncogénico completo (Land et al., 1983; Newbold and Overell, 1983; Ruley, 1983).

La activación de Ras en células primarias conduce a la entrada en OIS. Por lo tanto, para lograr la transformación, la activación de Ras tiene que ir acompañada de la inmortalización causada por otros factores oncogénicos que provoquen la disrupción de la ruta de p53 o de p16/Rb, como la proteína oncogénica adenoviral E1a (*Adenoviral early region 1A*) (Ruley, 1983), o la expresión del oncogén *c-Myc* (Land et al., 1983).

Además, esta cooperación es importante no solo para el inicio, sino también para el mantenimiento tumoral. La contribución de la cooperación oncogénica en el mantenimiento del tumor pudo comprobarse *in vivo* mediante el apagado de HrasV12, procedente de

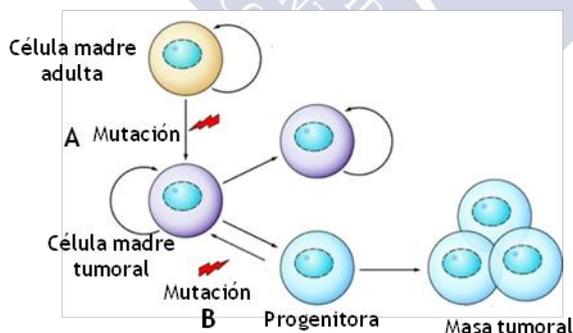
## INTRODUCCIÓN

un sistema inducible por doxiciplina, en melanomas generados en ratones deficientes para *Ink4a*. El apagado de la señal de Ras en estos tumores provoca la regresión histológica, lo que indica que estos tumores, una vez establecidos, son todavía dependientes de la actividad oncogénica (Chin et al., 1999).

### 3.6. Células madre en cáncer

Los tumores son heterogéneos, están compuestos por distintos tipos de células formando parte de la masa tumoral. Uno de los modelos más aceptados para explicar el inicio y desarrollo tumoral es el modelo de las células madre del cáncer (CSC, *Cancer Stem Cells*) (Marjanovic et al., 2013). Este modelo postula que, al igual que en los tejidos adultos, existe una fracción de las células del tumor con características de célula madre, con capacidad de autorrenovarse y de diferenciarse a los distintos tipos celulares que conforman el tumor.

Existen varias hipótesis acerca de qué células son las que dan origen a esta población de CSC. Estas CSC pueden derivar de la transformación de células madre adultas presentes en los tejidos o de células tumorales diferenciadas que sufren un proceso de dediferenciación, tras un proceso de EMT o una reprogramación hacia un estado más indiferenciado (**Figura 8**).



**Figura 8. Modelo de células madre del cáncer.** Las CSCs pueden originarse a partir de mutaciones en células madre adultas (A) o a partir de mutaciones en células diferenciadas que le confieren propiedades de célula madre (B). Estas CSCs poseen la capacidad de autorrenovarse y de originar distintos tipos de células que conforman la masa tumoral. (Imagen adaptada de Greenow and Clarke, 2012. Permitido por The American Physiological Society).

El origen de las CSC a partir de células madre adultas está respaldado por las similitudes existentes entre las células madre y las CSCs, como son la capacidad de autorrenovación y la capacidad de generar una progenie diferenciada; junto con la mayor persistencia de estas células en el tejido, lo que permite más tiempo para la acumulación de mutaciones (Islam et al., 2015). Además, apoyando este origen, se han encontrado patrones de expresión similares a los de ESCs en tumores poco diferenciados (Ben-Porath et al., 2008).

Estas CSCs son más resistentes a las terapias que las células diferenciadas presentes en el tumor. Además, son células que pueden permanecer en estado quiescente durante largos períodos en los tejidos por lo que se les considera las responsables de las recidivas. Todo esto hace necesario profundizar en el estudio de esta población de CSCs para el desarrollo de terapias más efectivas.

### **3.7. Modelos animales para el estudio del cáncer**

El cáncer es una enfermedad muy compleja en la que participan muchos factores, lo que hace necesario el desarrollo de modelos que permitan su estudio en profundidad. A pesar de que el estudio de las células tumorales *in vitro* aporta información muy valiosa acerca de las vías implicadas en el inicio y progresión del cáncer, es necesario desarrollar modelos de animales para completar esta caracterización.

#### **3.7.1. Modelos animales de activación genética del cáncer**

Existen numerosos modelos transgénicos para el estudio del cáncer. Los ratones *Knock-out* para los distintos supresores tumorales permiten analizar la contribución de estos al inicio tumoral. Del mismo modo, existen ratones que sobreexpresan o expresan de forma condicional distintos oncogenes.

Un ejemplo de estos modelos son los ratones transgénicos para Ras. El ratón  $Kras^{+/V12}$  es un ratón transgénico de inicio tumoral basado en el *Knock-In* (KI) de la versión mutante oncogénica KrasV12 en su propio alelo endógeno (Guerra et al., 2003). Este alelo mutante está precedido de una señal de *stop* flanqueada por sitios de recombinación loxP. De este modo se logra la expresión condicional del alelo KrasV12 mediante el tratamiento con la recombinasa Cre.

Además, el alelo KrasV12 va seguido de un casete IRES- $\beta$ geo que sirve para el marcaje y selección tras la recombinación.

La expresión de este alelo tras el nacimiento, empleando un sistema inducible para la expresión de la recombinasa, conduce a la formación de adenomas en pulmón y la progresión de alguno de ellos hacia adenocarcinomas, tras un largo período de latencia, lo que pone de manifiesto que se necesitan eventos oncogénicos cooperantes para desembocar en el desarrollo del cáncer. Las consecuencias de la expresión de Ras oncogénico en este modelo dependen del tipo celular y del momento en el desarrollo en el que se produzcan.

El análisis de las distintas lesiones obtenidas en estos ratones permitió observar cómo las lesiones premalignas de tipo adenoma, son senescentes, lo que constituye una barrera al desarrollo tumoral *in vivo*. Por el contrario, las escasas lesiones que consiguen progresar hacia un estado tumoral avanzado y maligno, los adenocarcinomas, son negativos para los marcadores de senescencia (Collado et al., 2005).

### ***3.7.2. Modelos animales de carcinogénesis química***

Existen muchos modelos de carcinogénesis química para inducir la formación de distintos tipos de tumores.

El proceso de carcinogénesis implica varias etapas. El protocolo de carcinogénesis química basado en el tratamiento con DMBA/TPA en piel representa uno de los modelos de carcinogénesis en dos etapas más definido. Este modelo se basa en una primera etapa de iniciación, producida por el tratamiento con el carcinógeno DMBA (7, 12-dimetilbenzantraceno) que provoca lesiones genéticas en las células de la piel. El análisis de los tumores obtenidos con este protocolo reveló que estas mutaciones se producen mayoritariamente en el codón 61 de *H-Ras* (Quintanilla et al., 1986). La segunda etapa, de promoción, requiere del tratamiento con TPA (12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato) para inducir la proliferación de estas células dañadas, lo que desencadena la formación de tumores de tipo papiloma. Algunos de estos papilomas progresan hacia carcinomas de células escamosas (Abel et al., 2009).

Existen otros modelos cuya progresión está menos definida. Por ejemplo, el 3-metilcolantreno (3-MCA) es un hidrocarburo aromático policíclico que actúa como un potente carcinógeno. El tratamiento con 3-MCA por inyección intramuscular provoca múltiples mutaciones aleatorias. La selección de células con mutaciones en genes claves para el desarrollo tumoral, como en oncogenes de la familia Ras o en supresores de tumores como p53 (Halevy et al., 1991; Watanabe et al., 1999) desencadenará la formación de un tumor predominantemente de tipo fibrosarcoma.

#### **4. REPROGRAMACIÓN CELULAR Y CÁNCER**

Los dos procesos mencionados hasta ahora, la reprogramación celular y la transformación oncogénica, comparten características comunes. Estas similitudes se dan tanto en las células resultantes de ambos procesos, como en los mecanismos implicados en ellos.

##### **4.1. Células iPS y células tumorales**

Las células sometidas a la reprogramación celular, así como las que sufren un proceso de transformación oncogénica experimentan un cambio en la identidad celular como consecuencia de ambos procesos. Este cambio de identidad celular da lugar a tipos celulares que comparten características comunes.

Las iPSC obtenidas tras el proceso de reprogramación celular se caracterizan por adquirir una capacidad proliferativa ilimitada y la capacidad de originar tipos celulares distintos, la pluripotencia (Takahashi and Yamanaka, 2006). Las células tumorales adquieren también una capacidad proliferativa ilimitada, ya que logran evadir las señales antiproliferativas y escapan de la senescencia (Hanahan and Weinberg, 2000). Además, según el tipo de tumor del que se trate, estas células tumorales sufren cierto grado de desdiferenciación.

Reforzando estas similitudes, se ha encontrado un patrón de expresión característico de células embrionarias en tumores poco diferenciados, lo que resulta indicativo de vías comunes implicadas en ambos procesos (Ben-Porath et al., 2008).

Por otro lado, el modelo de inicio y desarrollo tumoral basado en las CSC, inicialmente descrito en tumores hematológicos (Lapidot et al., 1994) y posteriormente en algunos tumores sólidos (Gupta et al., 2009), sugiere un posible papel de la reprogramación hacia un estado más indiferenciado de las células tumorales como origen de la población de CSC.

### **4.2. Mecanismos comunes**

Estos procesos no solo coinciden en algunas de las características de las células resultantes, sino que también presentan similitudes en los mecanismos implicados en ambos.

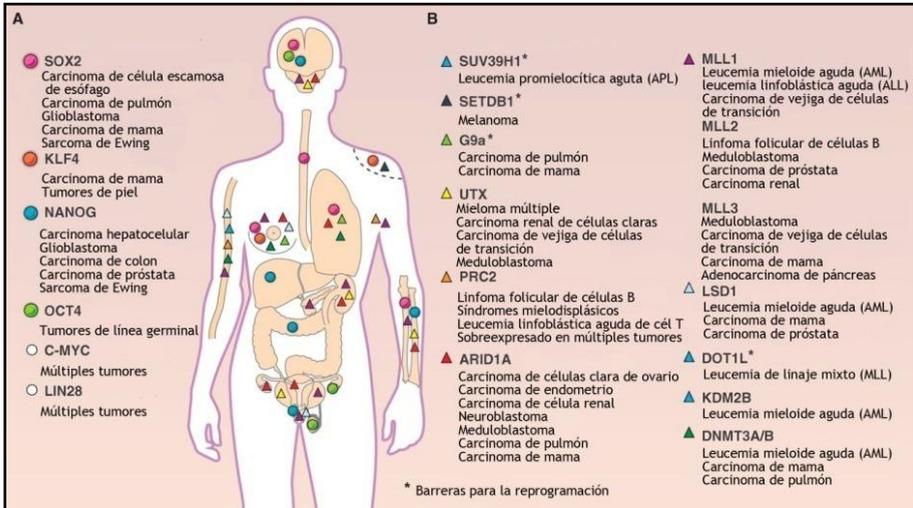
#### **4.2.1. Factores de transcripción**

Los propios factores de transcripción empleados por Yamanaka (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*) para generar iPSC están relacionados con el cáncer.

El ejemplo más claro es *c-Myc*, un importante oncogén que produce la inmortalización mediante la activación de la telomerasa (Wang et al., 1998) y que aparece amplificado en distintos tumores humanos (Beroukhim et al., 2010). Aunque inicialmente se incluyó en el cóctel de reprogramación, poco después se lograron obtener células iPSC prescindiendo de la expresión ectópica de *c-Myc* (Nakagawa et al., 2008).

Los factores *Oct4* y *Sox2* también tienen implicaciones en cáncer. La desregulación de estos genes conlleva alteraciones en la homeostasis tisular que pueden conducir a la tumorigénesis. *Oct4* no se expresa en ningún tejido o tumor adulto, sin embargo, desarrolla un importante papel en el inicio de tumores de la línea germinal (Gidekel et al., 2003; Hochedlinger et al., 2005). *Sox2*, además de su papel en el desarrollo embrionario, se expresa en algunos tejidos en adultos. Su desregulación está implicada en el desarrollo de carcinomas escamosos de esófago y pulmón y en glioblastomas. Además se ha encontrado amplificado en otros tumores humanos y su expresión parece estar asociada a las CSC de estos tumores (Wuebben et al., 2017). *Klf4* parece desempeñar funciones opuestas, promoviendo o suprimiendo el desarrollo tumoral, dependiendo de la situación celular

en la que se dé su expresión (Rowland and Peeper, 2006) (**Figura 9A**).



**Figura 9. Genes implicados en los procesos de reprogramación celular y transformación oncogénica.** Listado de factores de transcripción (**A**) y de reguladores de cromatina (**B**) implicados en reprogramación celular junto con los tumores en los que tienen funciones establecidas. (Imagen adaptada de Suvà et al., 2013. Permitido por The American Association for the Advancement of Science).

Los modelos de ratones transgénicos reprogramables han permitido demostrar la implicación de estos factores en ambos procesos. La expresión de los factores OSKM *in vivo* puede conducir a una reprogramación exitosa, dando lugar a células pluripotentes y teratomas (Abad et al., 2013). Sin embargo, con otro modelo de ratón reprogramable similar, observaron que cuando se produce una terminación prematura del proceso de reprogramación, sin que se alcance la pluripotencia, la expresión de estos mismos factores conduce a la formación de tumores en distintos tejidos. Estos tumores están formados por células displásicas indiferenciadas con un patrón de metilación del DNA alterado (Ohnishi et al., 2014). Estos resultados son indicativos de que los factores de transcripción empleados en reprogramación están también integrados en vías relacionadas con la transformación oncogénica.

### ***4.2.2. Remodelado epigenético***

La epigenética incluye todas las modificaciones que pueden modificar la expresión génica sin alterar la secuencia nucleotídica del DNA. Estas modificaciones están influenciadas por el ambiente y no son heredables. Tanto en la reprogramación celular como en la transformación oncogénica se produce un remodelado del perfil epigenético de las células parentales.

Las células indiferenciadas se caracterizan por presentar la cromatina en un estado accesible y a medida que se avanza hacia estadios más diferenciados, esta cromatina se compacta y adquiere marcas que silenciarán la expresión de genes de pluripotencia y permitirán la expresión de los genes propios de la célula somática. Durante la reprogramación celular se produce un borrado parcial de todas estas marcas epigenéticas adquiridas, lo que permite alcanzar la pluripotencia (Apostolou and Hochedlinger, 2013), aunque las células iPSC conservan cierta memoria epigenética asociada al linaje del que proceden las células parentales (Kim et al., 2010).

El cáncer tiene, además de un componente genético, un importante componente epigenético. Procesos como la metilación del DNA, la modificación de histonas y el remodelado de los nucleosomas están implicados en la regulación de muchos procesos biológicos que son fundamentales para la génesis del cáncer. Alteraciones en estas vías epigenéticas pueden dar lugar a la adquisición del estado transformado (Dawson and Kouzarides, 2012).

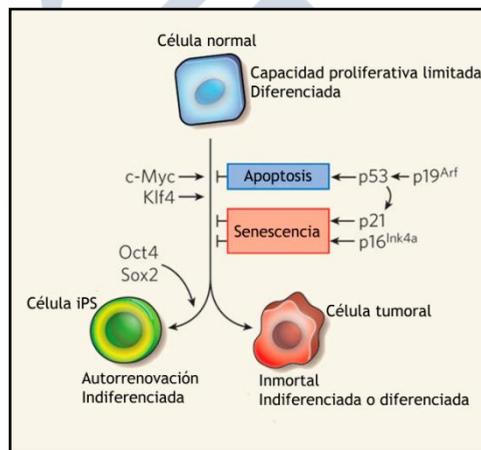
En este remodelado epigenético juegan un papel clave los remodeladores de cromatina, capaces de modificar el estado de la cromatina de abierto a cerrado y viceversa, mediante la alteración de la posición de los nucleosomas y que introducen modificaciones epigenéticas que alteran la expresión génica.

Se han encontrado múltiples remodeladores de cromatina cuya función está alterada en diferentes tumores. La modulación de la actividad de estos remodeladores durante la reprogramación celular es capaz de alterar su eficiencia, lo que demuestra la implicación de estas moléculas en ambos procesos (Suvà et al., 2013) (**Figura 9B**). Por

ejemplo, la metiltransferasa de histona H3K79, Dot1L, que aparece mutada en la leucemia de linaje mixto, actúa como un inhibidor del proceso de reprogramación. La demetilasa Kdm2b, que demetila la H3K36, promueve la formación de iPSC y contribuye al desarrollo y mantenimiento de células madre de leucemia (Onder et al., 2012).

### 4.3. Barreras comunes

Se encuentran también similitudes entre la reprogramación celular y el cáncer en las barreras que actúan oponiéndose al cambio de identidad sufrido en ambos procesos. En el año 2009 se publicaron simultáneamente seis trabajos en los que se identificaron las principales barreras celulares para la obtención de iPSCs (Banito et al., 2009; Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009; Li et al., 2009; Marión et al., 2009; Utikal et al., 2009a) (**Figura 10**).



**Figura 10. Mecanismos comunes que controlan la generación de células iPSC y tumorales.** Los fibroblastos normales son células diferenciadas con una capacidad proliferativa limitada que pueden reprogramarse a iPSC o transformarse hacia célula tumoral mediante la combinación de factores definidos. El supresor tumoral p53, que puede ser inducido por p19<sup>Arf</sup>, actúa como barrera para ambos procesos mediante la inducción de senescencia celular o de apoptosis. Esta barrera puede estar mediada directamente por p53 o indirectamente, a través de p21. El supresor tumoral p16<sup>Ink4a</sup> desencadena también la entrada en senescencia oponiéndose a ambos procesos. (Imagen adaptada de Krizhanovsky and Lowe, 2009. Con permiso de Elsevier).

### **4.3.1. El guardián del genoma, p53**

Uno de los supresores tumorales más importantes, p53, conocido como el guardián del genoma, ha sido descrito también como barrera para el proceso de reprogramación celular. La introducción de los factores de reprogramación OSKM en células primarias desencadena la activación de p53 y de sus efectores, como p21, en respuesta al daño en el DNA (Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009). Esta activación de la vía de p53 tiene como consecuencia una baja eficiencia de reprogramación. Esto se ve agudizado si las células parentales presentan algún daño previo a la introducción de los factores, como por ejemplo la existencia de daño en el DNA o la falta de telomerasa; en este caso la activación de p53 es mayor y conduce a la apoptosis, bloqueando por tanto la generación de células iPS. Se trata de un mecanismo que evita la generación de células pluripotentes a partir de células parentales que se encuentran en condiciones subóptimas (Marión et al., 2009). Células carentes de p53 presentan una mayor eficiencia de reprogramación, aunque la falta de este supresor tumoral acarrea posibles problemas asociados a una mayor inestabilidad genómica.

### **4.3.2. Locus *Ink4/Arf***

El locus *Ink4/Arf*, otro importante supresor tumoral, impone también una barrera a la obtención de iPSC. Este locus, compuesto por los genes *Cdkn2a* y *Cdkn2b*, que codifican para los supresores tumorales  $p16^{\text{Ink4a}}$ ,  $p15^{\text{Ink4b}}$  y  $p19^{\text{Arf}}$ , se expresa a nivel basal en células somáticas, pero no se expresa en células pluripotentes, tanto ES como iPS. Durante el proceso de reprogramación se requiere que se produzca su silenciamiento. Al observar que este silenciamiento se produce en células en las cuales el locus *Ink4/Arf* no es funcional, como son los MEFs expresando el antígeno Large-T del virus SV40 que bloquea las vías de Rb y p53, se comprobó que no se trata del resultado de un proceso selectivo que favorezca la reprogramación de células con bajo nivel de *Ink4/Arf* de partida, si no que se trata de un proceso intrínseco a la reprogramación celular. (Li et al., 2009).

La reprogramación de MEFs deficientes para este locus tiene una eficiencia mayor que en MEFs wt, poniendo de manifiesto que su

expresión constituye una barrera para la obtención de iPSC (Banito et al., 2009; Kawamura et al., 2009; Li et al., 2009; Utikal et al., 2009a). La falta de p19<sup>Arf</sup> aumenta la eficiencia de reprogramación hasta niveles similares a los obtenidos con la falta de p53, lo que indica que su efecto está mediado por la vía de p53 y, al menos en parte, p21. Células que carecen tanto de p16<sup>Ink4a</sup> como de p19<sup>Arf</sup> presentan una eficiencia todavía superior, indicativa de la implicación de la vía de pRb en este proceso, imponiendo una barrera a la obtención de iPSC.

Durante el envejecimiento, así como durante los pases en cultivo, los niveles de expresión de p16<sup>Ink4a</sup> en las células aumentan hasta conducir a la entrada en senescencia replicativa. Acorde con esto, las células en pase tardío presentan una menor eficiencia de reprogramación y con la inmortalización por falta de estos supresores tumorales se logra sobrepasar esta barrera (Banito et al., 2009; Li et al., 2009; Utikal et al., 2009a).

Todas estas vías juegan un papel fundamental en mecanismos antiproliferativos importantes en cáncer, como son la apoptosis y la senescencia celular. La introducción de los factores de reprogramación en las células somáticas puede desencadenar también estas respuestas, de forma similar a lo que ocurre tras la activación oncogénica. Modulando estas vías se consigue alterar la eficiencia de reprogramación. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la alteración de estas importantes vías supresoras de tumores, no solo incrementa el número de colonias de iPSC obtenidas, sino que puede tener efectos perjudiciales sobre las células resultantes, que presentan una mayor inestabilidad genómica y una mayor capacidad tumorogénica, lo que es perjudicial para su posible uso en aplicaciones terapéuticas (Krizhanovsky and Lowe, 2009).

#### **4.4. Mecanismos implicados en la reprogramación celular *in vivo***

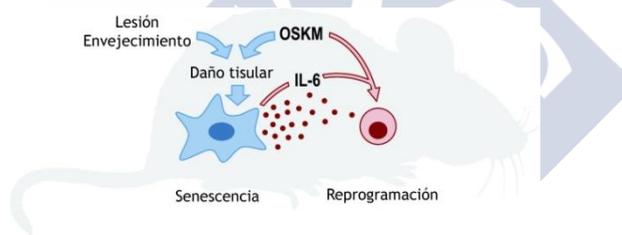
La expresión ectópica de los factores OSKM *in vivo* produce eventos de desdiferenciación y reprogramación en distintos tejidos (Abad et al., 2013). De igual modo que ocurre *in vitro*, la eficiencia del proceso es muy baja. Se ha estudiado como afectan las barreras

## INTRODUCCIÓN

que se oponen a la generación de iPSC *in vitro* a la reprogramación *in vivo*.

El análisis de los tejidos tras la expresión de los factores OSKM reveló que esta expresión produce dos efectos distintos en el tejido. Mientras que algunas células consiguen reprogramarse hasta alcanzar la pluripotencia, otras responden a los factores desencadenando respuestas celulares al daño, que conducen a la entrada en senescencia celular. De este modo, la senescencia y la reprogramación coexisten en grupos de células distintos pero próximos.

Esta respuesta de senescencia, descrita como una barrera intrínseca a la reprogramación *in vitro*, parece desempeñar funciones distintas cuando se analiza en un contexto más complejo. *In vivo*, pese a que las células senescentes imponen una barrera intrínseca a la reprogramación, los factores solubles del SASP secretados por estas células actúan favoreciendo la reprogramación de manera paracrina, generando una mayor plasticidad en las células del entorno (Chiche et al., 2017; Mosteiro et al., 2016) (**Figura 11**).



**Figura 11. Interacción entre senescencia celular y la reprogramación impulsada por OSKM.** La expresión de OSKM *in vivo*, además de inducir la reprogramación de una pequeña población de células, también induce daño y senescencia en muchas otras células. Las células senescentes liberan factores que promueven la reprogramación de las células vecinas, siendo IL-6 un mediador crítico. La lesión tisular y el envejecimiento, a través de la acumulación de células senescentes, favorecen la reprogramación *in vivo*. (Imagen adaptada de Mosteiro et al., 2016. Con permiso de The American Association for the Advancement of Science).

La reprogramación *in vivo* en ratones reprogramables cruzados con los ratones deficientes para p53 o para p16<sup>Ink4a</sup>/p19<sup>Arf</sup> permitió caracterizar mejor este efecto. La falta de p53 conduce a un importante daño tisular y a una respuesta masiva de senescencia, lo que favorece la reprogramación. Por el contrario, la falta de Ink4a/Arf

impide la entrada en senescencia y por tanto la reprogramación. La disección genética en profundidad de esta respuesta identificó a p16<sup>Ink4a</sup> como su principal mediador (Mosteiro et al., 2017).

Además, modulando la respuesta de senescencia celular, mediante el empleo de compuestos químicos que la estimulan o que eliminan selectivamente las células senescentes, se consigue alterar la eficiencia de reprogramación (Chiche et al., 2017; Mosteiro et al., 2016).

La búsqueda de los factores solubles responsables de este efecto permitió identificar a Il6, una citoquina proinflamatoria presente en el SASP, como uno de los principales mediadores de este efecto paracrino. Esta citoquina ya había sido descrita previamente como favorecedora del proceso de reprogramación nuclear mediante fusión celular (Brady et al., 2013).

Este efecto paracrino del SASP favoreciendo la plasticidad celular puede incluso llegar a permitir la reprogramación de tejidos normalmente resistentes como son el pulmón o el músculo esquelético. En estos tejidos, a pesar de responder a la doxyciclina expresando los factores OSKM, no se produce la reprogramación. Sin embargo, si aumentamos la respuesta de senescencia celular, combinando la expresión de los factores con algún otro tipo de daño, se consiguen obtener eventos de reprogramación. En pulmón, el tratamiento con bleomicina induce fibrosis y senescencia lo que propicia la aparición de células pluripotentes (Mosteiro et al., 2016). En músculo esquelético, la inducción de daño tisular, mediante la inyección de cardiotoxina (CTX) o empleando un modelo animal de distrofia muscular, combinado con la expresión de los factores, permite la aparición de teratomas resultado de la reprogramación de las células satélite del músculo (Chiche et al., 2017).

Este efecto de la senescencia favoreciendo la plasticidad celular se ha observado también en situaciones fisiológicas, sin la expresión de los factores de reprogramación. La exposición transitoria a factores del SASP provoca la adquisición de un estado más plástico y un patrón de expresión asociado a células madre en células epiteliales y en hígado (Ritschka et al., 2017).

### **5. REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES**

Desde el descubrimiento de la reprogramación celular en el año 2006, el número de tipos celulares que se ha logrado reprogramar con éxito ha ido creciendo notablemente. Pese a ello, la reprogramación exitosa de células tumorales continúa suponiendo un reto, con escasos ejemplos reportados de verdaderas iPSC obtenidas a partir de células transformadas (Kim and Zaret, 2015; Yilmazer et al., 2015).

El cáncer es una enfermedad compleja que tiene un componente genético, constituido por mutaciones en oncogenes o en genes supresores de tumores, pero también un importante componente epigenético. Mediante la reprogramación de células tumorales sería posible llevar a cabo el borrado epigenético en estas células, lo que permitiría analizar la contribución de cada uno de estos componentes al desarrollo de la patología. Si logramos revertir las células tumorales hasta un estado previo a la transformación, las células iPSC resultantes servirían como un buen modelo para el estudio del inicio y avance tumoral. Además, estas iPSC proporcionarían un sistema valioso para la búsqueda de nuevos tratamientos.

Teniendo en cuenta las similitudes entre los procesos de reprogramación celular y transformación oncogénica antes mencionadas, cabría esperar que la obtención de células iPS a partir de células tumorales resultase eficiente. Sin embargo, no ocurre así. Esto nos hace plantearnos la existencia de características propias de las células tumorales que actúen como barreras para la reprogramación, aunque estas no han sido todavía identificadas. La identificación de estas características esenciales de la identidad celular tumoral, mediante el estudio de la reprogramación en estas células, puede ser de utilidad para plantear futuras terapias contra el cáncer.

#### **5.1. Reprogramación de células tumorales mediante SCNT**

Previamente al desarrollo de la tecnología de reprogramación mediante la expresión ectópica de los factores OSKM, se trataron de generar células pluripotentes a partir de distintos tipos de células tumorales mediante la técnica de transferencia nuclear de células somáticas (SCNT).

Se empleó esta técnica con células de meduloblastoma de ratón derivadas de un ratón transgénico heterocigoto para el supresor tumoral Ptc ( $Ptc^{+/-}$ ). Tras la transferencia nuclear se consiguen obtener células con características de ES. Sin embargo, cuando se analiza su contribución al desarrollo, estas células solo permiten un desarrollo embrionario parcial. Las quimeras generadas con estas células no son viables debido a defectos en la diferenciación (Li et al., 2003). El mismo proceso se llevó a cabo con células de carcinoma embrionario. Las células pluripotentes obtenidas adquieren de nuevo, tras la diferenciación, las características tumorogénicas propias de las células parentales. Esta reactivación de las propiedades tumorogénicas de las células parentales indica que en este tipo de tumor las modificaciones genéticas, que no logran revertirse mediante la transferencia nuclear, son las responsables del potencial tumorogénico de estas células. (Blelloch et al., 2004).

Se sometieron también al proceso de SCNT distintos tipos celulares tumorales: células de leucemia, linfoma, cáncer de mama y melanoma. De ellas, solo las células derivadas de un melanoma generado en ratones deficientes para los supresores tumorales Ink4a/Arf y con expresión inducible de Ras consiguieron generar células pluripotentes. Pese a que estas células contribuyeron a la formación de quimeras viables, los ratones desarrollaron melanomas con una alta incidencia y un corto período de latencia (Hochedlinger et al., 2004).

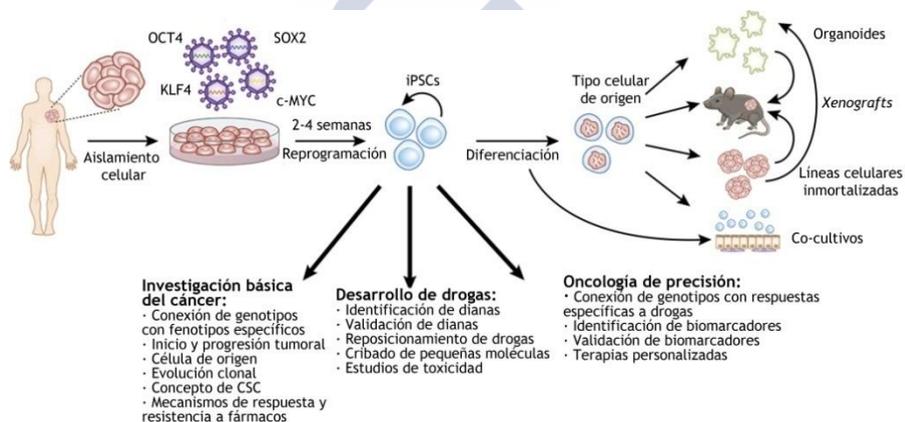
Estos experimentos de SCNT en distintos tipos de células tumorales permitieron comprobar que no todas las células tumorales son igual de susceptibles a la reprogramación. Además, aunque estas células contribuyen de forma correcta a las primeras etapas del desarrollo, incluso llegando a generar quimeras viables, tras la diferenciación adquieren de nuevo características tumorogénicas propias de las células parentales, especialmente asociadas al linaje del que proceden (Kim and Zaret, 2015).

## **5.2. Reprogramación celular a iPSC**

Con el desarrollo de la tecnología de reprogramación celular mediante la expresión ectópica de factores de transcripción

## INTRODUCCIÓN

específicos, el número de intentos de reprogramación de células tumorales continuó aumentando ya que la tecnología necesaria es más sencilla y se evitan los problemas éticos asociados al trabajo con células embrionarias. Sin embargo, los éxitos siguen siendo reducidos. A pesar de ello, los trabajos en los que se ha logrado la reprogramación de células tumorales muestran resultados prometedores que propician el avance de la investigación en este campo. A continuación se indican algunos ejemplos de reprogramación de células de distintos tipos de cáncer. Estos trabajos permiten estudiar la contribución del componente epigenético en ciertos tumores, desarrollar nuevos modelos de desarrollo tumoral, buscar nuevas terapias o mostrar la reprogramación como terapia (**Figura 12**).



**Figura 12. Reprogramación de células tumorales.** Las células tumorales se aíslan a partir de distintos tipos de tumores. Una vez establecido el cultivo celular, se introducen los factores de transcripción: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*, o combinaciones alternativas; mediante distintos vectores retrovirales, lentivirales, episomales o Virus Sendai. Después de un período de 2-4 semanas, aparecen colonias con la morfología característica de las células pluripotentes que se expanden para generar nuevas líneas. Estas células se pueden diferenciar al tipo celular de origen del tumor inicial y emplearse en distintos modelos para el estudio del cáncer: formación de organoides, derivado de líneas celulares inmortalizadas, *xenografts* y co-cultivos. (Imagen adaptada de Papapetrou, 2016. Con permiso de Springer Nature).

### ***5.2.1. Contribución del componente epigenético***

El glioblastoma es el tumor de cerebro más prevalente y agresivo. Se origina a partir de una población de células madre tumorales inmaduras que comparten similitudes con las células madre neurales pero que presentan lesiones epigenéticas características (Martinez et al., 2009).

En el año 2013 se consiguieron reprogramar células madre neurales de glioblastoma (GBM) mediante la expresión exógena de *Oct4* y *Klf4*. El análisis del perfil epigenético de las células parentales y de las células iPS resultantes muestra como tras la reprogramación se altera el patrón de metilación característico de GBM en estas células, afectando a la expresión de supresores tumorales. Sin embargo, tras someter estas células a un proceso de diferenciación y ensayar su capacidad tumorigénica *in vivo*, encontraron que a pesar de haber sido reprogramadas, generan de nuevo GBM al ser inyectadas en cerebro y solo mediante la diferenciación dirigida hacia otro tipo celular pierden esta capacidad (Stricker et al., 2013).

Estos resultados ponen de manifiesto que la imposición de un epigenoma asociado con un linaje distinto del neural puede suprimir el comportamiento tumoral. Por el contrario, en el linaje neural, el cambio epigenético no es suficiente para imponerse al genoma del cáncer.

### ***5.2.2. Modelos de desarrollo tumoral***

El adenocarcinoma pancreático ductal es un tumor con muy mal pronóstico, con menos de un 5% de tasa de supervivencia. Esto es debido a que se suele diagnosticar en estadios avanzados por la ausencia de sintomatología y la escasez de biomarcadores para la detección precoz. Además se carece de modelos que recapitulen el desarrollo tumoral (Hezel et al., 2006).

Kim et al. trataron de reprogramar células derivadas de estos tumores mediante la expresión de vectores lentivirales inducibles para los factores *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc* junto con el rtTA. El resultado de esta reprogramación fueron colonias similares a iPSC, pero que dependen de la expresión exógena de los factores de reprogramación

para mantenerse en estado indiferenciado, por lo que no se trata de verdaderas iPSC. A pesar de ello, permitieron establecer un modelo de desarrollo tumoral. Al inyectarlas en ratones de manera subcutánea para evaluar la capacidad de diferenciación *in vivo* son capaces de formar teratomas. En estos teratomas se encontró una diferenciación predominante hacia estructuras propias del endodermo. Además se observaron lesiones de tipo PanIN (neoplasia intraepitelial pancreática), consideradas precursoras del adenocarcinoma. Si dejan evolucionar estos teratomas, estas lesiones PanIN progresan hasta estadios invasivos, recapitulando así el desarrollo tumoral pancreático (Kim et al., 2013).

Este trabajo muestra la utilidad de las iPSC para establecer nuevos modelos de desarrollo tumoral, que permiten avanzar en el conocimiento de una patología y las vías implicadas en ella, lo que resulta fundamental para la búsqueda de biomarcadores y de posibles estrategias terapéuticas.

### **5.2.3. Desarrollo de nuevas terapias**

La primera fase de la leucemia mieloide crónica (CML, *Chronic Myeloid Leukemia*) es el resultado de la fusión BCR-ABL en las células madre hematopoyéticas, lo que provoca la proliferación de estas células. Cuando se alcanza la fase blástica, estas células pierden la capacidad de diferenciarse correctamente como resultado de un segundo evento oncogénico. El tratamiento empleado, un inhibidor de la oncoproteína BCR-ABL, no logra erradicar completamente la patología, haciendo necesario el tratamiento de manera continuada (Melo and Barnes, 2007).

En el año 2010, Carette et al. lograron reprogramar la línea celular KBM7, derivada de la fase blástica de la CML, mediante la introducción de los factores OSKM con vectores retrovirales (Carette et al., 2010). Las iPSC resultantes fueron capaces de diferenciarse correctamente a los distintos linajes hematopoyéticos, recapitulando la fase crónica de la CML. Se observó que las células iPSC, a pesar de mantener la expresión oncogénica, no son sensibles al tratamiento con Imatinib, el inhibidor de BCR-ABL empleado en la clínica, y solo tras

la diferenciación hacia células del linaje hematopoyético se vuelven de nuevo sensibles.

Cuando se reprogramaron células obtenidas de pacientes con CML en fase crónica se observó de nuevo que las iPSC son resistentes a Imatinib y que recuperan la sensibilidad tras la diferenciación hacia tipos celulares del linaje hematopoyético (Kumano et al., 2012).

En estos trabajos se establece un modelo en el que se observa cómo las células iPS, a pesar de que retienen la expresión del oncogén, no presentan la dependencia oncogénica que se da específicamente en las células diferenciadas del linaje adecuado. El Imatinib solo es efectivo en células con un estado epigenético de diferenciación específico, lo que podría justificar por qué el tratamiento no erradica completamente la enfermedad. Esta dependencia oncogénica en una fase y no en otra debería ser tenida en cuenta para el desarrollo de nuevas terapias.

#### **5.2.4. Reprogramación como terapia**

La reprogramación celular en algunos casos provoca alteraciones en la capacidad tumorigénica de las células parentales. La reprogramación de líneas celulares de cáncer gastrointestinal mediante la expresión de los factores retrovirales OSKM genera células iPS que, a diferencia de las células parentales, pueden ser diferenciadas *in vitro* a distintos tipos celulares y son más sensibles a agentes quimioterapéuticos (Miyoshi et al., 2010).

La reprogramación de líneas celulares humanas de sarcoma mediante la expresión de los factores *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc*, *Nanog* y *Lin28* genera colonias de células que cumplen las características propias de las iPSC *in vitro*. Sin embargo, el análisis global del patrón de metilación y de expresión sitúa a estas células más próximas a fibroblastos parcialmente reprogramados y al sarcoma parental que a verdaderas iPSC. Esta desdiferenciación, aunque no alcance la reprogramación completa, es suficiente para que estas células puedan llegar a diferenciarse correctamente, en contraste con lo que ocurre con las células parentales que presentan defectos en la diferenciación responsables de su capacidad tumorigénica (Zhang et al., 2013). Con

## INTRODUCCIÓN

estos ejemplos se pone de manifiesto que la reprogramación de células tumorales puede inducir la disminución de tumorigenicidad.

En estos trabajos se observa que no todos los tipos celulares tumorales son igual de susceptibles a la reprogramación. Además, las células derivadas de distintos tipos de cáncer presentan características propias que dificultan el establecimiento de un protocolo común. Según el tipo celular se han empleado distintas combinaciones de factores de reprogramación. Por ejemplo, células de melanoma que expresan de forma endógena *Sox2*, pueden ser reprogramadas prescindiendo de *Sox2* exógeno (Utikal et al., 2009b).

Por otro lado, las células resultantes de la reprogramación de células tumorales no siempre reúnen las características propias de las células iPSC. En algunas ocasiones, requieren la expresión ectópica continuada de los factores para mantenerse en estado desdiferenciado (Kim et al., 2013). Además su diferenciación está, en muchos casos, condicionada por el linaje parental del que proceden al conservarse cierta memoria que puede estar asociada con su capacidad tumorigénica (Papapetrou, 2016).

A pesar de las limitaciones y dificultades existentes, estos ejemplos ponen de manifiesto la utilidad del sistema de reprogramación celular en la investigación del cáncer. La posibilidad de revertir el estado de transformación celular mediante la tecnología de reprogramación permite establecer nuevos y valiosos modelos para el estudio del inicio y la progresión tumoral. Además, descifrar las características propias de la célula tumoral que las hacen refractarias al cambio sufrido durante la reprogramación celular, resulta prometedor para comprender mejor la identidad tumoral y desarrollar estrategias terapéuticas efectivas.



## **OBJETIVOS**



Desde el descubrimiento de la reprogramación celular se han logrado reprogramar con éxito numerosos tipos celulares. Sin embargo, los ejemplos exitosos de reprogramación de células tumorales son muy escasos.

La reprogramación y transformación oncogénica son procesos relacionados en los que participan mecanismos comunes. A pesar de la existencia de barreras comunes que regulan ambos procesos, las células transformadas parecen presentar barreras adicionales específicas que se oponen a la reprogramación hacia iPSC.

Teniendo esto en cuenta nos planteamos abordar el estudio del efecto de la activación oncogénica, impulsora de la transformación, sobre el proceso de reprogramación.

Los objetivos específicos del proyecto de tesis han sido:

1. Estudio del efecto la activación oncogénica sobre el proceso de reprogramación.

1.1. Caracterizar el efecto de la activación del oncogén Ras sobre la reprogramación de células primarias.

1.2. Análisis del efecto de distintos protocolos de carcinogénesis sobre el proceso de reprogramación celular *in vivo*.

2. Estudio de la reprogramación de células transformadas.

2.1. Reprogramación de células transformadas *in vitro* mediante cooperación oncogénica.

2.2. Reprogramación de líneas celulares derivadas de tumores.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**





## 1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los procedimientos experimentales realizados con animales en esta tesis cuentan con la aprobación del Comité de Bioética de la Universidad de Santiago de Compostela (USC) respetando las Leyes de Protección de los Animales utilizados para experimentación y otros fines científicos a nivel Estatal y Europeo. Estos procedimientos se realizaron bajo las autorizaciones 15005AE/07/01/02/05C/AVF2, según el RD 1201/2005, de la que es investigador responsable Anxo Vidal y 15001/17/001, según el actual y vigente RD 53/2013, de la que es investigador responsable Manuel Collado. Los procedimientos experimentales fueron realizados por Manuel Collado, capacitado para las funciones B y C.

### 1.1. Condiciones de estabulación

Los animales de experimentación empleados en este trabajo se mantuvieron estabulados en el animalario del CIMUS (Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas de la USC) con número de registro: ES150780275701. La cría y mantenimiento de las colonias se realizó en salas SPF (*Specific Pathogen Free*), mientras que algunos de los procedimientos experimentales se realizaron en salas convencionales. En ambos casos, los animales se encontraban bajo condiciones controladas de fotoperiodo (12 horas de luz/oscuridad) y temperatura (20-24°C).

### 1.2. Ratón reprogramable i4F

El modelo de ratón reprogramable empleado fue la línea transgénica i4F-B (Abad et al., 2013). Este modelo presenta un casete poliestrónico que codifica para los cuatro factores de reprogramación (OSKM: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*) bajo el control de un promotor inducible por tetraciclina (TetOP) en un intrón del gen *Pparg*. En el locus *Rosa26* presenta, además, el transactivador reverso dependiente de tetraciclina (rtTA, *reverse tetracycline-controlled transactivator*). En presencia de doxiciclina, el rtTA se une al promotor del casete OSKM permitiendo la expresión de los factores de reprogramación (**Figura 1**). La colonia de ratones transgénicos fue mantenida en heterocigosis en un fondo genético puro C57BL/6.

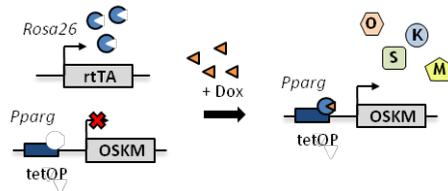


Figura 1. Representación esquemática del ratón reprogramable i4F.

### 1.3. Ratón KrasV12-KI

El modelo de ratón transgénico empleado para la activación genética del cáncer fue el ratón *knock-in* (KI) Kras<sup>+V12</sup> (Guerra et al., 2003). Este ratón presenta un alelo transgénico KrasV12-IRES-β-geo insertado en uno de los alelos del locus endógeno de Kras. Este alelo transgénico contiene, en el primer intrón, una señal transcripcional de stop flanqueada por sitios de recombinación loxP. El tratamiento con la recombinasa Cre provoca la escisión de esta señal de stop, permitiendo la expresión de KrasV12 y de la proteína de marcaje β-geo, que confiere resistencia a G418 y actividad β-galactosidasa (**Figura 2**). La colonia de ratones transgénicos fue mantenida en heterocigosis en un fondo genético puro C57BL/6.

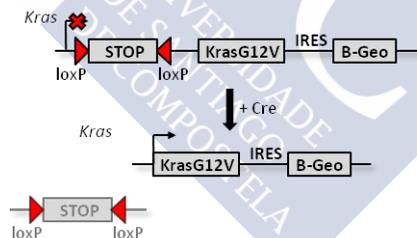


Figura 2. Representación esquemática del ratón KrasV12-KI

### 1.4. Ratones NRMI-nu “nude”

Los ratones NMRI-*Foxn1*<sup>nu/nu</sup> presentan una mutación autosómica recesiva en el gen *Foxn1* (*Forkhead box N1*) que causa aplasia del timo, lo que resulta en inmunodeficiencia. Además estos ratones presentan un defecto en la queratinización del folículo piloso y la epidermis, por lo que carecen de pelo (*nude*). En este trabajo empleamos hembras de 6 semanas obtenidas de los Laboratorios Janvier.

### 1.5. Genotipado

El genotipado de las distintas líneas transgénicas se realizó a partir de DNA genómico extraído de un pequeño trozo de la cola del ratón, cortado en el momento del destete. La extracción se realizó mediante incubación con 200  $\mu$ L de Chelex 10% (*Chelex 100 Sodium form*) (Sigma-Aldrich) y 400  $\mu$ g de proteasa (*Protease from Streptomyces griseus*) (Sigma-Aldrich) a 60°C en agitación durante la noche (ON, *overnight*). Tras la inactivación de la proteasa por incubación a 95°C durante 15 minutos, se centrifugan las muestras a 10.000 rpm durante 1 minuto para precipitar los fragmentos no digeridos y los restos de Chelex. El sobrenadante, donde se encuentra el DNA, se empleó directamente para la amplificación por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de los alelos *wild type* (wt) o transgénicos (tg).

La PCR se realizó con el kit *NZYTaq DNA polymerase* (NzyTech), dNTPS (Sigma-Aldrich) y los oligonucleótidos (Eurofins) recogidos en la siguiente tabla (**tabla 1**) en un termociclador *MultiGene<sup>TM</sup> OptiMax* (Labnet).

Línea	Oligo.	Secuencia 5'→3'	Alelo
i4F	125B	AAA GTC GCT CTG AGT TGT TAT	Rosa26 común
	126B	GCG AAG AGT TTG TCC TCA ACC	Rosa26 tg
	127B	GGA GCG GGA GAA ATG GAT ATG	Rosa26 wt
	ORF2- FW	GGA TGG AGT GGG ACA GAG AA	OSKM-Fw
	ORF2-RV	GTG CCG ATC CGT TCA CTA AT	OSKM-Rv
Kras-KI	UTR-Kras1	CAC TGG ACA CTG AGG GTC A	Kras wt
	UTR-Kras2	CAT ACT GGG TCT GCC TTA	Kras común
	CLNEO	GAT GCC TGC TTG CCG AAT AT	Kras tg

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para el genotipado de las distintas líneas transgénicas y alelos que amplifican

- **Genotipado i4F:**

Las condiciones empleadas para el genotipado de los ratones i4F fueron: *Taq Polymerase Buffer* 1X, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,75 mM dNTPs, 0,15 $\mu$ M de cada uno de los oligonucleótidos y 2 U de Taq. El programa de amplificación empleado fue:

40 ciclos						
Temperatura	95 °C	95 °C	59 °C	72 °C	72 °C	4 °C
Tiempo	5'	45''	45''	1'	5'	∞

• **Genotipado Kras-KI:**

Las condiciones empleadas para el genotipado de los ratones Kras-KI fueron: *Taq Polymerase Buffer* 1X, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 0,8 μM del oligonucleótido común (UTR-Kras2) y 0,4 μM de cada uno de los restantes (UTR-Kras1, CLNEO) y 2 U de Taq. El programa de amplificación empleado fue:

34 ciclos						
Temperatura	94°C	94°C	60°C	75°C	75°C	4 °C
Tiempo	2'	40''	40''	1'	10'	∞

Tras la PCR los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Conda) al 1,5% en TAE 1x (40mM Tris-acetato, 2mM EDTA) con *RedSafe™ Nucleic Acid Staining Solution* (Intron Biotechnology) para su visualización en un transiluminador de luz ultravioleta *UVP BioDoc-It™ Imaging System*. El marcador de tamaño de DNA empleado fue *NZYDNA ladder V 100pb* (NzyTech).

**2. PROTOCOLOS DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL**

**2.1. Tratamiento con doxiciclina *in vivo***

**2.1.1. Doxiciclina en agua de bebida**

El tratamiento sistémico con doxiciclina *in vivo* se realizó mediante dilución en el agua de bebida. Se emplearon distintas concentraciones de doxiciclina (Fagron Ibérica) (2, 1 o 0,2 mg/mL) suplementadas con sacarosa (Sigma-Aldrich) al 5%-7,5%. El tratamiento se mantuvo protegido de la luz y se renovó cada dos días durante la duración del experimento.

Los ratones i4F se trataron con 0,2 mg/mL o 1 mg/mL de doxiciclina durante 2,5 semanas o 7 días, respectivamente. Las condiciones se detallan en cada uno de los experimentos en el

apartado de resultados. Los ratones *nude* o C57BL/6 wt se trataron con 2 mg/mL.

### **2.1.2. Doxiciclina en crema**

La doxiciclina en crema fue preparada por el Servicio de Farmacia del CHUS a partir de doxiciclina (Fagron Ibérica) al 2% o 10% en vaselina (Brum). Se aplicaron 500 mg de crema cada dos días.

### **2.2. Administración intratraqueal de Ad-Cre**

Los ratones KrasV12-KI se trataron, por vía intratraqueal, con partículas adenovirales que expresan la recombinasa Cre, a las 10-12 semanas de edad.

Las partículas adenovirales (Ad5-CMV-Cre) fueron producidas por la Unidad de Producción de Vectores (UPV) del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). En el momento del tratamiento, el vial de Ad-Cre ( $1 \times 10^{11}$  partículas físicas/100  $\mu$ L) se diluye en 100  $\mu$ L de PBS y se añade  $\text{CaCl}_2$  a una concentración final de 0,01 M. Cada ratón se trató con  $1 \times 10^{10}$  partículas en 20  $\mu$ L por vía intratraqueal y se administraron 3 volúmenes (0,5 mL) de aire para favorecer la dispersión por los pulmones.

Los ratones se anestesiaron mediante inyección intraperitoneal de Medetomidina (Domtor) (1 mg/kg) y Ketamina (Ketolar) (75 mg/kg). La anestesia se revirtió mediante inyección intraperitoneal de Atipamezol (Antisedan) (1mg/kg).

### **2.3. Tratamiento con DMBA**

El DMBA (7, 12-dimetilbenzantraceno) (Sigma-Aldrich) se diluyó en acetona (Sigma-Aldrich) a 1 mg/mL. Dos días antes del tratamiento, se afeita la parte superior del lomo de los ratones que será tratada. Cada ratón se trató con 100  $\mu$ L de la solución de DMBA. Al día siguiente se comenzó el tratamiento con la crema de doxiciclina.

### **2.4. Inyección de 3-MCA**

El 3-MCA (3-metilcolantreno, Sigma-Aldrich) se diluyó en aceite de girasol (Sigma-Aldrich) a una concentración de 20-25  $\mu$ g/ $\mu$ L. La

## MATERIALES Y MÉTODOS

suspensión se sonicó en hielo hasta conseguir una emulsión homogénea sin restos cristalizados.

Cada ratón se inyectó con 1 mg de 3-MCA de forma intramuscular, con jeringas de 25G. En los experimentos de reprogramación *in vivo*, se preparó un solución a 25  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de la que se inyectaron 40  $\mu\text{L}$  en el músculo *tibialis anterior* (TA). Para la generación de fibrosarcomas de los que se derivaron las líneas celulares, la suspensión se preparó a 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  y se inyectaron 50  $\mu\text{L}$  en la parte alta de la pata trasera.

### **2.5. Inyección de células**

#### ***2.5.1. Inyección de células en riñón***

Cada ratón se inyectó con  $5 \times 10^5$  células en 50  $\mu\text{L}$  de medio de iPSC/ESC en el riñón izquierdo. Se realizó una pequeña incisión en el costado izquierdo desde la cual se accede al riñón. Tras la inyección con una jeringa de 25 G, se suturó el peritoneo y se cerró la herida en la piel con grapas. Los ratones se anestesiaron mediante equipos de anestesia inhalatoria con isoflurano (Esteve).

#### ***2.5.2. Inyección subcutánea***

Para la formación de tumores subcutáneos a partir de las líneas celulares de fibrosarcoma se emplearon ratones *nude*. Se realizaron 4 inyecciones por ratón, dos en cada costado. En cada punto se inyectaron  $1 \times 10^6$  células en 50  $\mu\text{L}$  de medio de ESC/iPSC con jeringas de 25G. Los ratones se anestesiaron mediante equipos de anestesia inhalatoria con isoflurano (Esteve).

El tamaño de los tumores subcutáneos se midió con un calibre electrónico digital (FST) dos veces a la semana. Se tomaron tres medidas (ancho, alto, largo) de cada tumor a partir de las cuales se determinó el volumen ( $\text{mm}^3$ ).

## **3. CULTIVOS CELULARES**

### **3.1. Cultivo primario de MEFs wt, i4F, p53-null y Arf-null**

Los fibroblastos primarios procedentes de ratones wt, i4F, p53-null y Arf-null se obtuvieron a partir de embriones en el día 13,5 de

gestación. La hembra preñada se sacrifica mediante dislocación cervical y se extrae el útero con los embriones, que se mantienen en PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Sigma-Aldrich) frío suplementado con penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich). Los embriones se extraen del útero en ambiente estéril y se mantienen individualizados en placas de cultivo celular con PBS. Se descartan los tejidos viscerales y parte de la cabeza, que se empleó para el genotipado (apartado 1.5). El resto del cuerpo se disgregó con ayuda de bisturíes y digestión enzimática con tripsina. Se añaden 1,5 mL de tripsina-EDTA 1x (Sigma-Aldrich) sobre el embrión disgregado y se incuba 10 minutos a 37°C. Tras la incubación se homogeniza con ayuda de una pipeta de 1 mL y se incuba de nuevo 10 minutos a 37°C. Una vez tripsinizados, se resuspendieron en medio de cultivo y se sembraron en placas de cultivo de 100 mm. Al día siguiente se realizan dos lavados con PBS para eliminar restos de tejido o células no adheridas y se añade medio de cultivo nuevo. Una vez confluentes se tripsinizan y expanden. Tras un pase en cultivo, se congelaron en alícuotas en medio de congelación, FBS con 10% DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich), y se mantuvieron en nitrógeno líquido.

Los MEFs se mantuvieron en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) con alta concentración de glucosa (4500 mg/L) (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*) (Sigma-Aldrich), penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) y L-glutamina (Sigma-Aldrich). Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y atmósfera húmeda.

### **3.2. Derivación de líneas celulares de fibrosarcoma**

Las líneas tumorales de fibrosarcoma se derivaron a partir de tumores inducidos por la inyección intramuscular de 3-MCA (Sigma-Aldrich). Una vez formado el tumor, los ratones fueron sacrificados para extraer la masa tumoral que se introdujo en PBS frío. El tumor se disgregó en ambiente estéril con la ayuda de dos bisturíes. Una vez disgregado, la suspensión resultante se sembró en placas de cultivo de 100 mm con medio DMEM con alta concentración de glucosa (4500 mg/L) (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% FBS (Sigma-Aldrich),

## MATERIALES Y MÉTODOS

penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) y L-glutamina (Sigma-Aldrich). Al día siguiente se realizan dos lavados con PBS para eliminar restos de tejido o células no adheridas y se añade medio de cultivo nuevo. Una vez confluentes se tripsinizaron y expandieron hasta obtener un cultivo homogéneo. Tras un par de pases en cultivo se congelaron en alícuotas con FBS y 10% DMSO. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y atmósfera húmeda.

### 3.3. Cultivo celular de iPSC y ESC

Las iPSC y ESC se mantuvieron en cultivo sobre células *feeders* o alimentadoras en placas gelatinizadas (apartado 3.5). El medio de cultivo empleado (medio de iPSC/ESCs) está compuesto por: DMEM con alta concentración de glucosa (4500 mg/L) (Sigma-Aldrich) suplementado con 15% de KSR (*KnockOut<sup>TM</sup> Serum Replacement*, GIBCO), penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich), L-glutamina (Sigma-Aldrich), 0,1 mM NEAA (*Non-essential aminoacids*, GIBCO), 0,1 mM de 2-mercaptoetanol (GIBCO) y 1000 u/mL de LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*, GIBCO). El medio se renovó cada dos días y las células se tripsinizaron cuando alcanzaban una confluencia del 80%. Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y atmósfera húmeda. Para su congelación se empleó medio de iPSCs/ESCs completo, suplementado con un 20% de FBS y un 10% de DMSO.

### 3.4. Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas en este trabajo fueron: HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293T*) y 3T3 (fibroblastos inmortalizados por pases seriados). Ambos tipos se mantuvieron en medio DMEM con alta concentración de glucosa (4500 mg/L) (Sigma-Aldrich) suplementado con 10% FBS (Sigma-Aldrich), penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) y L-glutamina (Sigma-Aldrich). Las células se mantuvieron en un incubador a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y atmósfera húmeda.

### 3.5. Preparación de *feeders*

Las células *feeders* se prepararon a partir de MEFs wt en pase 3 o células 3T3. Las células fueron inactivadas mitóticamente con

Mitomicina C (Inibsa) a una concentración de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , durante 2-3 horas. Tras esta incubación, se lavaron exhaustivamente con PBS para eliminar completamente los restos de Mitomicina C, se tripsinizaron y se congelaron en alícuotas de  $3 \times 10^6$  células en medio de congelación (FBS, 10% DMSO).

Cada alícuota se descongeló en una placa de 100 mm gelatinizada, o en placas con una superficie equivalente. Las placas se trataron con gelatina (Sigma-Aldrich) al 0,1% (w/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT, *room temperature*). A continuación, se retiró la gelatina y se sembraron las células *feeders* en medio de cultivo de fibroblastos. Las células *feeders* se descongelaron el día anterior al pase de las células iPS o ES.

### 3.6. Tratamientos

Los tratamientos celulares empleados en este trabajo han sido:

- **Doxiciclina** (Sigma-Aldrich): análogo de la tetraciclina, empleado como inductor para los sistemas de expresión inducibles regulados por el transactivador reverso dependiente de tetraciclina (rtTA): MEFs i4F y vectores lentivirales (Tet-O-OSKM, pInducer20-EV, pInducer20-HrasV12). La concentración empleada ha sido 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se renovó cada 48 horas.

- **Mitomicina C** (Inibsa): agente citotóxico empleado para inactivar mitóticamente las células *feeders*. La concentración empleada ha sido 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 2-3 horas de incubación.

- **PD0325901** (Axon Medchem): inhibidor de Mek empleado a distintos tiempos durante la reprogramación celular. La concentración empleada ha sido 50  $\mu\text{M}$ .

## 4. VECTORES PLASMÍDICOS

### 4.1. Microorganismos empleados

Los microorganismos empleados para amplificar el DNA plasmídico han sido: bacterias *E. coli* competentes de la cepa DH5 $\alpha$ , para los vectores retrovirales; o de la cepa Stbl2, para los vectores lentivirales.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para la producción de proteínas recombinantes se empleó la cepa BL21 (apartado 12).

### 4.2. Medios de cultivo bacterianos empleados

• **Medio LB (*Luria-Broth*):** para el crecimiento en medio líquido se empleó el medio LB compuesto por 1% triptona (Becton Dickinson, BD), 0,5% extracto de levadura (BD) y 0,5% cloruro de sodio (Sigma-Aldrich) en agua destilada. El medio se suplementó con el antibiótico adecuado según la resistencia que confiera el plásmido: ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (Sigma-Aldrich) o kanamicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (GIBCO).

• **Medio LB Agar.** Para el aislamiento y selección de las bacterias transformadas se empleó el medio sólido LB Agar, con la misma composición que el medio LB líquido y suplementado con 1,5% de LB Agar (Sigma-Aldrich). Los antibióticos empleados fueron los mismos que en el medio líquido.

### 4.3. Obtención del DNA plasmídico

La extracción del DNA plasmídico a partir de cultivos bacterianos se realizó con el kit comercial *Genopure Plasmid Midi* (Roche), para la realización de *Midipreps*; o bien el kit *QIAfilter™ Plasmid Maxi* (Qiagen) para la obtención de DNA a gran escala mediante *Maxipreps*. En ambos casos, la extracción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

La cuantificación del DNA plasmídico obtenido se realizó en un *NanoDrop 2000c Spectrophotometer* (ThermoScientific).

### 4.4. Plásmidos

En la siguiente tabla (**tabla 2**) se recogen los plásmidos empleados en este trabajo:

Plásmido	Referencia
pCL-Eco	Addgene #12371 (Naviaux et al., 1996)
pLP1	ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen)
pLP2	ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen)
pLP-VSVG	ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen)

pBP-IRES-EGFP	Addgene #14430	Laboratorio L. Miguel Martins (no publicado)
pBP-HrasWT	Addgene #18744	Laboratorio Scott Lowe (no publicado)
pBP-HrasV12	Addgene #1768	Laboratorio Bob Weinberg (no publicado)
pBP-HrasV12C40	Addgene #18747	Laboratorio Scott Lowe (no publicado)
pBP-HrasV12G37	Addgene #18745	Laboratorio Scott Lowe (no publicado)
pBP-HrasV12E38	Laboratorio Mariano Barbacid	
pBP-KrasWT	Laboratorio Mariano Barbacid	
pBP-KrasV12	Laboratorio Mariano Barbacid	
pBP-NrasWT	Laboratorio Mariano Barbacid	
pBP-NrasV12	Laboratorio Mariano Barbacid	
pBP-BrafV600E	Laboratorio Mariano Barbacid	
pMXs-Oct3/4	Addgene #13366	(Takahashi and Yamanaka, 2006)
pMXs-Sox2	Addgene #13367	(Takahashi and Yamanaka, 2006)
pMXs-Klf4	Addgene #13370	(Takahashi and Yamanaka, 2006)
pMXs-c-Myc	Addgene #13375	(Takahashi and Yamanaka, 2006)
Tet-O-FUW-OSKM	Addgene #20321	(Carey et al., 2009) (Figura 3)
FUW-M2rtTA	Addgene #20342	(Hockemeyer et al., 2008)
FUGW	Addgene #14883	(Lois et al., 2002)
pInducer20-EV	Addgene #44012	(Meerbrey et al., 2011)
pInducer20-HrasV12	(Alexander et al., 2013) (Figura 4)	

Tabla 2. Plásmidos empleados en este trabajo



Figura 3. Representación esquemática del plásmido Tet-O-FUW-OSKM. El casete policistrónico que codifica para los cuatro factores de reprogramación (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*) se encuentra bajo el control de un promotor dependiente de tetraciclina (TetOP).



Figura 4. Representación esquemática del plásmido pInducer20-HrasV12. La expresión de *HrasV12* está controlada por un promotor dependiente de tetraciclina (TRE2), mientras que la expresión del *rtTA* y del gen de resistencia a la neomicina se produce a partir de un promotor constitutivo (Ubc).

### 5. TRANSDUCCIÓN RETROVIRAL Y LENTIVIRAL

Las partículas retro- o lentivirales se generaron en células HEK293T mediante co-transfección con el plásmido de interés y los plásmidos empaquetadores correspondientes: pCL-Eco, para las partículas retrovirales; y el sistema de tercera generación basado en los plásmidos pLP1, pLP2 y pLP-VSVG, para las partículas lentivirales.

#### 5.1. Transfección celular

La transfección de células HEK293T se realizó empleando el agente de transfección, polietilenimina (PEI) (Polysciences). El día previo a la transfección, se sembraron  $5 \times 10^6$  células HEK293T por placa de 100 mm. Para la transfección se realizaron dos mezclas:

- Por un lado, se mezcla el plásmido de interés con el empaquetador retroviral o los empaquetadores lentivirales, en proporción 1:1 o 1:(1:1:1), respectivamente, y se diluye en medio DMEM (Sigma-Aldrich) sin suplementar. Para una placa de 100 mm se emplearon 5  $\mu$ g totales de DNA en 250  $\mu$ L de volumen.

- Por otro lado, se realiza una mezcla del PEI (1 mg/mL), en una relación 1:6 (DNA: PEI), con medio DMEM (Sigma-Aldrich) sin suplementar. Se emplearon 30  $\mu$ L de PEI para los 5  $\mu$ g de DNA en 250  $\mu$ L de volumen.

A continuación se juntan las dos mezclas anteriores, se homogenizan mediante vórtex y se incuban 10 minutos a RT. La mezcla (500  $\mu$ L) se añade, gota a gota, al cultivo de HEK293T. Tras 8-16 horas se realizaron dos lavados con PBS y se cambió el medio por medio fresco.

#### 5.2. Transducción

Transcurridas 36 horas desde la transfección, el sobrenadante de las células HEK293T, que contiene las partículas virales, se filtró a través de un filtro de 0,45  $\mu$ m (Jet Biofil) y se añadió *Polybrene* (*Hexadimethrine bromide*) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 8  $\mu$ g/mL. Se añadió medio fresco a las células HEK293T y el sobrenadante con los virus se utilizó sobre las células a transducir. Las

células diana se sembraron el día anterior y deben estar subconfluentes y proliferando durante la transducción. Este proceso se repitió cada 12 horas hasta realizar 3 rondas. Transcurridas 12 horas desde la última ronda, se cambió el medio de las células diana por medio fresco y se dio por finalizada la transducción.

## **6. REPROGRAMACIÓN CELULAR**

### **6.1. Reprogramación de MEFs i4F**

Para la reprogramación de MEFs derivados del ratón i4F se emplearon MEFs i4F en pase temprano (1 o 2). Se sembraron  $4 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 6 pocillos (Eppendorf) en medio de cultivo de fibroblastos. Al día siguiente se cambió el medio a medio de iPSC/ESCs con doxiciclina a  $1 \mu\text{g/mL}$ , este es el día 0 (T0) de nuestros experimentos de reprogramación. Durante los 12-14 días siguientes se cambió el medio, renovando la doxiciclina, cada dos días.

### **6.2. Reprogramación con vectores retrovirales**

Para la reprogramación mediante el empleo de vectores retrovirales, se realizó la transducción retroviral (apartado 5) de MEFs de los distintos genotipos (wt, *p53-null* o *Arf-null*) con los plásmidos pMXs que expresan cada factor de reprogramación (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*) de manera independiente.

Se sembraron  $2 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 6 pocillos y se llevó a cabo la transducción retroviral. Tras 24 horas desde la última ronda de transducción, se cambió el medio de cultivo a medio de iPSC/ESCs (T0). Durante los 12-14 días siguientes se cambió el medio cada dos días.

### **6.3. Reprogramación con vectores lentivirales**

Para la reprogramación mediante el empleo de vectores lentivirales, se realizó la transducción lentiviral (apartado 5) de MEFs wt o de las líneas de fibrosarcoma, con el plásmido inducible Tet-O-FUW-OSKM y el plásmido rtTA.

Se sembraron  $2 \times 10^5$  células por pocillo en placas de 6 pocillos y se llevó a cabo la transducción lentiviral, 24 horas después de la

última ronda de transducción, se cambió el medio de cultivo a medio de iPSC/ESCs con doxiciclina a concentración final de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (T0). Durante los 12-14 días siguientes se cambió el medio, renovando la doxiciclina, cada dos días.

### **7. TINCIÓN FOSFATASA ALCALINA (AP)**

La actividad AP en las células iPS, tras el proceso de reprogramación, se detectó colorimétricamente empleando los kits comerciales: *Vector Red Substrate Kit* (Vector Labs) y *Alkaline Phosphatase Blue Membrane Substrate Solution* (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las células se fijaron con formaldehído (EMS, Electron Microscopy Sciences) al 4% en PBS durante 10 minutos a RT. Una vez fijadas, se realizaron dos lavados con PBS. Las células se incubaron con la solución de tinción en oscuridad a RT durante 15-30 minutos. Tras la tinción, las células se lavaron con PBS y las placas se escanearon en el escáner fotográfico *Epson Perfection V550 Photo* (Epson). Para la cuantificación del número de colonias positivas se empleó el software libre *ImageJ*.

### **8. PICADO Y EXPANSIÓN DE COLONIAS iPSCs**

Para la obtención de clones de iPSC se realizó el picado y expansión de colonias individuales. El medio de las células iPS se cambia por medio fresco 2-3 horas antes del picado. En el momento del picado, el medio se substituye por medio DMEM sin suplementar. Usando un microscopio óptico (*Primo Vert Microscope*, Zeiss) situado dentro de una campana de flujo laminar, las colonias se recogen con una micropipeta en un volumen de 10  $\mu\text{L}$  de medio y se transfieren de manera individual a un tubo de 0,2 mL en el que añadimos 30  $\mu\text{L}$  de Tripsina-EDTA 1x (Sigma-Aldrich) donde se incuban a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$  durante 5 minutos. Tras la incubación, se añadieron 70  $\mu\text{L}$  de medio de iPSC/ESCs a cada tubo para neutralizar la acción de la tripsina y la suspensión se pipetea arriba y abajo unas 10 veces para terminar de disgregar las colonias. El contenido de cada uno de los tubos se sembró en un pocillo de una placa de 96 pocillos

con *feeders*, a la que previamente se le había cambiado el medio por 100  $\mu$ L de medio de iPSC/ESCs. El medio se renovó cada dos días.

Cuando las células alcanzaron el 80-90% de confluencia, se tripsinizaron y expandieron a placas de mayor tamaño con *feeders*, hasta llegar a placas de 100 mm, a partir de las cuales se congelaron alícuotas en medio de congelación de iPSC/ESCs o se emplearon en los distintos ensayos realizados.

## 9. PROTOCOLOS DE DIFERENCIACIÓN

### 9.1. Diferenciación *in vitro*: formación de *embryoid bodies*

La técnica empleada para la formación de cuerpos embrioides (EB, *Embryoid Bodies*) ha sido *hanging drop*. Las células iPSC se tripsinizan y cuentan, se prepara una suspensión celular a una concentración de  $2,5 \times 10^5$  células/mL en medio de EB: DMEM (Sigma-Aldrich), 10% FBS (Sigma-Aldrich), 1% Penicilina/Estreptomicina (Sigma-Aldrich), 1% L-glutamina (Sigma-Aldrich), 0,1 mM NEAA (*Non-essential aminoacids*, GIBCO), 0,1mM de 2-mercaptoetanol (GIBCO). Sobre la tapa de una placa Petri se depositan gotas de 20  $\mu$ L de la suspensión celular. El fondo de la placa se cubre con PBS y se cierra con la tapa de modo que las gotas queden colgando. Estas placas se incubaron durante 3 días a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Tras los 3 días, las gotas se recogieron con medio de EB y se pasaron a una placa Petri con 10 mL de medio de EB. El medio se reemplazó cada 3 días.

Los EB fueron recogidos para analizar mediante qRT-PCR la expresión de marcadores de diferenciación de las tres capas embrionarias: endodermo (*Gata4*, *Gata6*), mesodermo (*Nkx2.5*, *Brachyury*) y ectodermo (*Dlx3*, *Gfap*).

### 9.2. Diferenciación *in vivo*: formación de teratomas

Para la formación de teratomas se inyectaron  $5 \times 10^5$  células en 50  $\mu$ L de medio de iPSC/ESC en el riñón de ratones wt de la cepa C57BL/6.

Las células iPSC se tripsinizaron y contaron para ajustar el número de células a inyectar. Se realizó un lavado con PBS y se

resuspendieron en medio de iPSC/ESCs a la concentración indicada. Las células se mantuvieron en frío hasta el momento de la inyección (apartado 2.5).

Se realizó el seguimiento de los ratones y tras detectar mediante palpación el crecimiento tumoral, los ratones fueron sacrificados y los tumores fueron procesados para su análisis histológico (apartado 18) por el Servicio de Anatomía Patológica del CHUS.

### **10. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE mRNA**

#### **10.1. Extracción de RNA**

Para el aislamiento de RNA a partir de células en cultivo celular o de EB se empleó el kit comercial *Nucleo Spin RNA* (Macherey-Nagel) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Para el aislamiento de RNA a partir de tejido se empleó el reactivo *Tri-Reagent RNA isolation* (Vibro) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se disgregaron 50 mg de tejido en un *TissueLyser II* (Qiagen) durante 3 minutos a 30 HZ en tubos de plástico de 2 mL con cierre de seguridad (Eppendorf) con dos bolas de acero inoxidable estériles.

La cuantificación se realizó en un *NanoDrop 2000c Spectrophotometer* (ThermoScientific).

#### **10.2. Síntesis de cDNA mediante retrotranscripción**

Para la retrotranscripción de RNA a cDNA se empleó el kit comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems) basado en la enzima *MultiScribe<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase*, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La retrotranscripción se realizó en el termociclador *MultiGene<sup>TM</sup> OptiMax* (Labnet).

#### **10.3. qRT-PCR**

La qRT-PCR se realizó con el reactivo *Brilliant III Ultra-Fast SYBR QPCR MasterMix* (Agilent Technologies) en un termociclador *AriaMx Real-Time PCR systems* (Agilent Technologies) con el programa:

	<i>Hot start</i>	Amplificación (40 ciclos)			<i>Melt</i>		
Temperatura	95 °C	95 °C	60°C	72 °C	95°C	55°C	95°C
Tiempo	3'	30''	30''	1'	1'	30''	30''

En cada reacción se utilizaron 33 ng de cDNA y oligonucleótidos a una concentración final de 0,25  $\mu$ M. Todas las reacciones se realizaron por triplicado para cada gen analizado y los valores obtenidos se relativizaron frente al *housekeeping Gapdh*.

Los resultados se analizaron con el *software AriaMx 1.0* (Agilent Technologies).

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo se recogen en la siguiente tabla (**tabla 3**) y fueron adquiridos en Eurofins Genomics:

Oligonucleótidos	Secuencia 5' → 3'
<i>Brachyury</i>	Fw: ATGCCAAAGAAAGAAACGAC Rv: AGAGGCTGTAGAACATGATT
<i>Cdkn1a</i>	Fw: GTGGGTCTGACTCCAGCCC Rv: CCTTCTCGTGAGACGCTTAC
<i>Dlx3</i>	Fw: GCTCCTCAGCATGACTACTACT Rv: CTGCGAGCCCATTGAGATTG
<i>Dppa3</i>	Fw: GACCCAATGAAGGACCTGAA Rv: GCTTGACACCGGGGTTTAG
<i>Essrb</i>	Fw: CCCTCAGCCCTAGGCACAT Rv: AGCCTGGGACTGCCTTTTG
<i>Fn1</i>	Fw: TTCAAGTGTGATCCCCATGAAG Rv: CAGGTCTACGGCAGTTGTCA
<i>Gapdh</i>	Fw: TCCATGACAACCTTTGGCATCGTGG Rv: GTTGCTGTTGAAGTCACAGGAGAC
<i>Gata4</i>	Fw: CCCTACCCAGCCTACATGG Rv: ACATATCGAGATTGGGGTGTCT
<i>Gata6</i>	Fw: TCATTACCTGTGCAATGCATGCGG Rv: ACGCCATAAGGTAGTGGTTGTGGT
<i>Gfap</i>	Fw: CCCTGGCTCGTGTGGATTT Rv: CATTGCGGCTCTAGGGACTC
<i>Il6</i>	Fw: GCTACCAAACCTGGATATAATCAGGA Rv: CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA

<i>Ink4a</i>	Fw: CGTACCCCGATTTCAGGTGAT Rv: TTGAGCAGAAGAGCTGCTACGT
<i>Klf4 total</i>	Fw: CACCATGGACCCGGGCGTGGCTGCCAGAAA Rv: TTAGGCTGTTCTTTTCCGGGGCCACGA
<i>Nanog</i>	Fw: AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG Rv: CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG
<i>Nkx2.5</i>	Fw: TTACCCGGGAGCCTACGGTG Rv: GCTTTCCGTCGCCGCCGTGCGC
<i>Nr5a2</i>	Fw: TCATGCTGCCAAAGTGAGAGA Rv: TGGTTTTGGACAGTTTCGCTT
<i>Oct4 endógeno</i>	Fw: TCTTTCCACCAGGCCCCGGGCTC Rv: TGCGGGCGGACATGGGGAGATCC
<i>Oct4 total</i>	Fw: GTTGGAGAAGGTGGAACCAA Rv: CCAAGGTGATCCTCTTCTGC
<i>Sox2 endógeno</i>	Fw: TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA Rv: TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA
<i>Sox2 total</i>	Fw: GGTTACCTCTTCTCCCACTCCAG Rv: TCACATGTGCGACAGGGGCA
<i>Ssea1</i>	Fw: GCGCTGTCCTAGTAGCGTA Rv: AGCCCTGGATCTTCTCTCAC
<i>Thy1</i>	Fw: CGCTCTCCTGCTAACAGTCTT Rv: CAGGCTGAACTCGTACTGGA

Tabla 3. Secuencias *Forward* (Fw) y *Reverse* (Rv) de los oligonucleótidos empleados en qRT-PCR

## 11. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA

### 11.1. Extracción de proteínas

Para la extracción proteica a partir de células en cultivo, las células se tripsinizaron y centrifugaron a 900 rpm durante 5 minutos. El pellet celular, tras un lavado con PBS, se resuspendió en *buffer* RIPA (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 5 mM EDTA ph 8.0, 1% Deoxicolato de sodio) con inhibidores: 1mM Ortovanadato sódico, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 4 mM NaF y 1x del cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). Tras 20 minutos de incubación en hielo, se completó la lisis en un baño sonicador durante 5 minutos o mediante lisis mecánica haciendo pasar el lisado a través de una jeringa de 29G. Las muestras se

centrifugaron a 14.000 rpm a 4°C durante 15 minutos y el sobrenadante proteico se transfirió a un tubo nuevo.

### 11.2. Cuantificación de proteínas

La cuantificación de los extractos proteicos se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976) empleando el kit comercial *DC Protein Assay* (BIO-RAD) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Para el calibrado se empleó una recta patrón con concentraciones conocidas de BSA (*Bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich). La absorbancia a 750 nm se midió en un espectrofotómetro para microplacas *Epoch2* (BioTech).

### 11.3. Western blot

El análisis de la expresión proteica se realizó mediante *Western blot* (WB). Para la electroforesis se prepararon 30 µg de proteína con tampón de carga (*Laemmli Buffer 2x*): 4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0,004% azul de bromofenol y 125 mM Tris-HCl pH 6.8. Las muestras se desnaturalizaron hirviéndolas a 95°C durante 5 minutos en un *thermoblock* (*Thermomixer Compact*, Eppendorf).

La electroforesis de los extractos proteicos se realizó en geles de poliacrilamida (solución 30%, Acrilamida/Bis 29:1, BIO-RAD) al 12%: 12% acrilamida/bisacrilamida, 372 mM Tris-HCl pH 8.8, 0,1% APS, 0,08% TEMED. Se emplearon también geles comerciales de electroforesis en gradiente 4-12% (*NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris Protein Gels*, ThermoFisher). El marcador de peso molecular empleado fue *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (ThermoScientific).

Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF de 0,45 µm (Millipore) mediante transferencia húmeda. La membrana se bloqueó con leche al 5% w/v en TTBS (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0,05% Tween-20) durante 1 hora a RT.

La incubación con los anticuerpos primarios correspondientes (**tabla 4**) se realizó ON (*overnight*) a 4°C. Los anticuerpos secundarios conjugados a la encima HRP (*Horseradish Peroxidase*) (**tabla 5**) se incubaron a RT durante 1 hora. La inmunodetección se realizó

empleando un sistema de quimioluminiscencia basado en ECL (*Enhanced chemiluminescence*), exposición a película autorradiográfica y revelado fotográfico.

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Huésped	Dilución
P-Erk	Cell signaling	4370	Conejo	1:2000
Erk	Cell signaling	4695	Conejo	1:2000
PAN-Ras (Ab-3)(RAS10)	Merck Millipore	OP40	Ratón	1:200
Tubulina	Sigma-Aldrich	T6199	Ratón	1:1000
p53 (1C12)	Cell signaling	2524	Ratón	1:1000
HRas	BD Biosciences	610001	Ratón	1:2000
Actina	MP Biomedicals	0869100	Ratón	1:5000

Tabla 4. Anticuerpos primarios empleados en *Western blot*

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Dilución
HRP-Anti conejo	Santa Cruz	Sc-2004	1:5000
HRP-Anti ratón	Santa Cruz	Sc-2005	1:2000

Tabla 5. Anticuerpos secundarios conjugados a HRP empleados en *Western blot*

## 12. PULL-DOWN RAS-GTP

Los niveles de activación de Ras en las células se determinaron mediante *pull-down* con la proteína RalGDS-RBD fusionada a GST. Esta proteína presenta un dominio de unión a Ras (RBD, *Ras Binding Domain*) de la proteína RalGDS, que tiene una alta afinidad por la forma activa de Ras (Ras-GTP). Esta proteína está fusionada a la Glutacion-S-Transferasa (GST) para poder acoplarla a una matriz de Glutacion-Sefarosa y realizar el *pull-down* (Franke et al., 1997).

### 12.1. Preparación del sistema de sefarosa con la proteína RalGDS-RBD fusionada a GST

La proteína de fusión RalGDS-RBD fusionada a GST se obtuvo mediante la transformación de las bacterias competentes de la cepa BL21 con el plásmido pGEX-RalGDS-RBD cedido por el laboratorio del Dr. Xosé Bustelo. El cultivo bacteriano se trata con IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido) 0,5 mM para inducir la expresión proteica y se incuba durante 4 horas a 37°C en agitación.

Tras la incubación, se centrifuga durante 20 minutos a 8.000 rpm. El *pellet* bacteriano se resuspende en el *buffer* PBST: 2 mM EDTA, 0,1%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,2 mM PMSF en PBS y se lisa mediante sonicación.

El lisado se centrifuga a 15.000 rpm y 4°C durante 30 minutos y se recoge el sobrenadante que contiene la proteína de fusión. Esta proteína se unió a la matriz de Glutation-Sefarosa mediante la incubación a 4°C durante 2 horas en un agitador rotatorio.

### **12.2. Pull-down a partir de extractos proteicos**

Los extractos proteicos se recogieron en buffer MLB (25 mM Hepes pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% IgePal, 2% glicerol, 1 mM EDTA y 10 mM  $MgCl_2$ ) con inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich). Tras la extracción de proteínas mediante lisis mecánica con jeringa de 29G, se cuantificó la cantidad de proteína mediante el método de Bradford.

Se incubaron 300  $\mu$ g de proteína a una concentración de 1  $\mu$ g/ $\mu$ L con 10  $\mu$ L del sistema RalGDS-RBD fusionada a GST unida a la matriz de Glutation-Sefarosa. La incubación se realizó en un agitador rotatorio a 4°C durante 2 horas. Tras la incubación se realizaron cuatro lavados con 500  $\mu$ L de buffer MLB sin inhibidores. Tras cada lavado se llevó a cabo la centrifugación durante 1 minuto a 1.000 rpm para que precipiten las bolas de la matriz. Tras el último lavado, se dejó un volumen de 10  $\mu$ L de buffer al que se le añade *buffer* de carga *Laemmli* a una concentración final 1x. Las muestras se hirvieron durante 5 minutos a 95°C y se cargaron en un gel de poliacrilamida para su análisis por *Western blot* (apartado 11.3).

### **13. ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS**

Para el ensayo de formación de colonias de transformación, se sembraron los distintos tipos celulares a baja densidad ( $5 \times 10^4$  células por placa 100 mm) y se mantuvieron en cultivo durante 2 semanas renovando el medio, y la doxiciclina en la condición correspondiente, cada dos días.

Una vez formadas las colonias, las células se lavaron con PBS y se fijaron con metanol frío durante 10 minutos. A continuación, se

incubaron con cristal violeta (Sigma-Aldrich) al 0,5% en agua destilada durante 15 minutos a RT. Se retiró la solución de tinción y se lavaron las células con agua destilada. Las placas se dejaron secar y se escanearon en el escáner fotográfico *Epson Perfection V550 Photo* (Epson). Para la cuantificación del número de colonias positivas se empleó el *software* libre *ImageJ*.

### **14. TRATAMIENTO CON MEDIOS CONDICIONADOS**

Los tratamientos con medios condicionados se realizaron con medios condicionados durante 24 horas por las células expresando Ras oncogénico. Tras las 24 horas en contacto con las células, los medios se recogieron y centrifugaron a 900 rpm durante 5 minutos para eliminar posibles células en suspensión. Tras la centrifugación se emplearon directamente sobre las células diana. En el caso de la reprogramación de MEFs i4F se les añadió doxiciclina a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### **15. COCULTIVO**

Los experimentos de cocultivo en reprogramación se realizaron mezclando los dos tipos celulares en proporción 1:1. Se sembraron  $4 \times 10^5$  células, en total, por pocillo de placa de 6 pocillos.

Para el cocultivo en *transwell* (Falcon) se sembraron  $3 \times 10^4$  células (células diana) en el fondo del pocillo de una placa de 12 pocillos. A continuación, se sembraron  $2,5 \times 10^4$  células en la parte superior del *transwell* que se colocó en el pocillo anterior. A los tiempos indicados, se retiró el *transwell* y se recogieron las células del fondo del pocillo para su análisis mediante qRT-PCR.

### **16. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA ASOCIADA A SENESCENCIA (SA- $\beta$ -GAL)**

#### **16.1. Ensayo con sustrato quimioluminiscente, Galactón.**

La determinación de la actividad SA- $\beta$ -Gal en células en cultivo se realizó a partir de extractos proteicos, mediante el empleo del sustrato quimioluminiscente, Galactón, empleando el kit *Galacto-LightPlus™  $\beta$ -Galactosidase Reporter Gene Assay System* (Applied Biosystems) incluyendo alguna modificación en el protocolo

proporcionado por el fabricante. Se ensayó la actividad enzimática a pH 5.5, lo que permite la detección de la actividad SA- $\beta$ -Gal.

Se recogieron extractos proteicos a distintos tiempos durante el proceso de reprogramación. En cada uno de los puntos de recogida se realizó el conteo del número de células con la cámara de *Neubauer* para relativizar los valores obtenidos.

Las células se lisaron mediante incubación en hielo con el *buffer Tropix Lysis Solution* e incubación durante 5 minutos en un baño sonicador. Las muestras se centrifugaron a 14.000 rpm y 4°C durante 15 minutos y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo.

El ensayo con Galactón se realizó en placas blancas de 96 pocillos (Corning). En cada reacción se emplearon 5  $\mu$ L del extracto proteico y 70  $\mu$ L del *buffer* de reacción (dilución 1:100 de *Tropix Galacton-Plus* en *buffer* ácido cítrico/fosfato sódico 200mM a pH 5.5). Tras una incubación de 30 minutos en oscuridad a RT, se añaden 100  $\mu$ L de acelerador (*Tropix Accelerator II*) y se mide, inmediatamente, la luminiscencia en un luminómetro *Mithras LB940* (Berthold Technologies) tras 1-2 segundos de retraso durante 1 segundo/pocillo. Cada muestra se analizó por triplicado y los resultados, en unidades arbitrarias, se normalizaron frente al número de células del que procede el extracto proteico.

### **16.2. Ensayo con sustrato cromogénico, X-Gal.**

La determinación de la actividad SA- $\beta$ -Gal en tejidos se realizó mediante el empleo del sustrato cromogénico X-gal según el protocolo previamente descrito (Dimri et al., 1995). Los tejidos fueron teñidos enteros (*whole mount*) y luego procesados para el análisis histológico.

El tejido fresco se lavó con PBS y se fijó con 2% formaldehído/0,2% glutaldehído durante 20 minutos a RT en agitación. Una vez fijado se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS y se incubó durante 6 horas a 37°C (sin CO<sub>2</sub>) con la solución de tinción: 1 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactoside (X-Gal) (Fisher), 40 mM ácido cítrico/fosfato sódico pH 5.5, 5 mM K<sub>3</sub>Fe[CN]<sub>6</sub>, 5 mM K<sub>4</sub>Fe[CN]<sub>6</sub>, 150 mM NaCl y 2 mM MgCl<sub>2</sub>. Tras la

tinción, el tejido se lavó y se procesó para su inclusión en parafina (apartado 17).

### **17. ANÁLISIS HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO**

El análisis histológico e inmunohistoquímico de los tejidos incluidos en parafina fue llevado a cabo por el Servicio de Anatomía Patológica del CHUS y el Servicio de Histopatología del CNIO.

#### **17.1. Procesado de tejidos**

Los tejidos analizados histológicamente en este trabajo fueron fijados en formalina (Panreac AppliChem) durante 24 horas y posteriormente deshidratados e incluidos en parafina (Millipore) en el procesador de tejidos *Leica ASP6025* o manualmente en el caso de tejidos teñidos para SA- $\beta$ -Gal.

El procesado automatizado lleva a cabo la deshidratación mediante el paso por alcoholes de gradación creciente, de 50° a 100°, el paso por xilol y la inclusión en parafina. En el caso de tejidos teñidos para SA- $\beta$ -Gal, la inclusión se realiza manualmente prescindiendo de los pasos con xilol, que es substituido por isopropanol.

Los tejidos incluidos en parafina fueron cortados en un micrótopo de rotación *Leica RM2255* en secciones de 3  $\mu$ m. Para las distintas tinciones las secciones se desparafinaron en xilol y se rehidrataron mediante el paso por alcoholes de gradación decreciente hasta llegar al agua.

#### **17.2. Tinción hematoxilina-eosina (H&E)**

El análisis histológico se realizó mediante la tinción H&E. Tras la rehidratación las secciones se tiñeron con hematoxilina (Panreac AppliChem) y Eosina (Millipore).

#### **17.3. Inmunohistoquímica de secciones de tejido incluidas en parafina**

La inmunohistoquímica con los distintos anticuerpos se realizó de manera automatizada con los equipos *Autostainer Link48* (Dako, Agilent) o *Ventana Discovery XT* (Roche). Tras la rehidratación de las

secciones, se realizó el desenmascaramiento antigénico a pH alto para los anticuerpos Ckæ1/æ3, Desmina y Gfap o a pH bajo para los anticuerpos Nanog y Oct4. La inhibición de la peroxidasa endógena se realizó con peróxido de hidrógeno al 3%. Las secciones se incubaron con los distintos anticuerpos primarios a las diluciones indicadas (**tabla 6**). Tras el anticuerpo primario, las secciones se incubaron con los sistemas de visualización *EnVision Duo FLEX* (Dako, Agilent) o *Omni Map anti-Rabbit* (Ventana Roche) conjugados a HRP. La reacción inmunohistoquímica se realizó con DAB (3, 30-diaminobenzidina tetrahidrocloruro) y los núcleos fueron contrateñidos con hematoxilina. Finalmente, las secciones fueron deshidratadas y montadas con medio de montaje permanente para su evaluación microscópica.

Anticuerpo	Clon	Casa comercial	Referencia	Dilución
Citoqueratina	AE1/AE3	Dako, Agilent	IR053	Listo para usar
Desmina	D33	Dako, Agilent	IR606	Listo para usar
Gfap		Dako, Agilent	IR524	Listo para usar
Nanog	D2A3	Cell Signaling	8822	1:100
Oct4		Abcam	Ab19857	1:500

Tabla 6. Anticuerpos primarios empleados en inmunohistoquímica

## 18. MICROSCOPIA

El microscopio empleado para la obtención de fotografías de células en cultivo o de secciones de tejidos ha sido el microscopio *AxioVert.A1 Microscope* (Zeiss) y el *software Zen Blue edition* (Zeiss).

El escaneado de secciones de tejido completas se realizó con el escáner de portaobjetos *AxioScan Z1* (Zeiss) y las imágenes se obtuvieron con el *software Zen Blue edition* (Zeiss).

## 19. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La significación estadística de los datos obtenidos se analizó mediante el test *t de Student* de dos colas o el test exacto de *Fisher*: \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*  $p < 0,05$ ; n.s. no significativo.





## **RESULTADOS**



## **1. EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE ONCOGENES ACTIVOS EN LA REPROGRAMACIÓN CELULAR**

Teniendo en cuenta las similitudes entre los procesos de reprogramación celular y transformación oncogénica, nos planteamos estudiar el efecto de la expresión de oncogenes activos sobre el proceso de reprogramación.

### **1.1. Efecto de la activación oncogénica sobre la reprogramación *in vitro***

Basándonos en el hecho de que las barreras para el desarrollo tumoral, como los supresores tumorales y la senescencia, actúan también oponiéndose a la reprogramación celular, quisimos analizar el efecto de los oncogenes, imprescindibles para la transformación oncogénica, en la generación de iPSC.

#### ***1.1.1. Ras oncogénico aumenta la eficiencia de reprogramación***

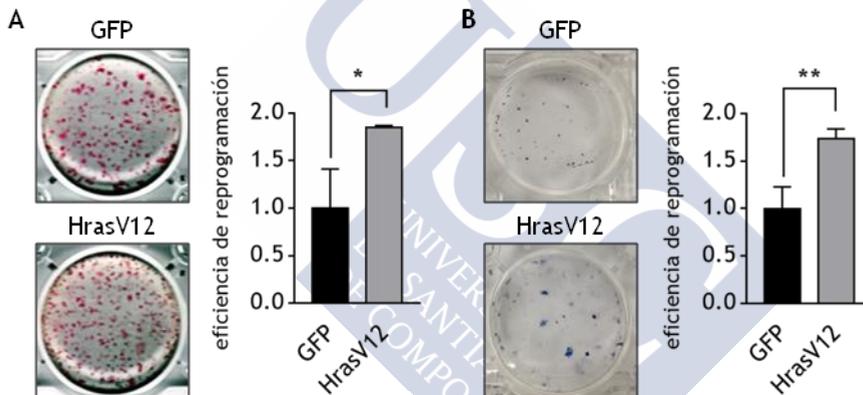
Para estudiar el efecto de la expresión de oncogenes activos sobre el proceso de reprogramación celular decidimos emplear el oncogén Ras. Seleccionamos este oncogén debido a su relevancia en el campo del cáncer, ya que se trata del primer oncogén descrito y uno de los más frecuentemente mutados en múltiples tumores. En concreto empleamos el mutante oncogénico HrasG12V (HrasV12) que presenta la sustitución de una glicina (G) por una valina (V) en posición 12, lo que provoca que se mantenga activo de forma constitutiva, sin posibilidad de ser desactivado (Cox and Der, 2010).

Expresamos el mutante oncogénico, HrasV12, mediante transducción retroviral junto con los factores de reprogramación, *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc* (OSKM) en MEFs *wild type* (wt). Como control empleamos la combinación de los cuatro factores de reprogramación junto con el mismo vector retroviral expresando GFP (*Green Fluorescence Protein*). Observamos que la introducción de HrasV12 como cofactor en el cóctel de reprogramación produce un aumento en la eficiencia del proceso comparada con el control que expresa GFP, cuantificada como el número de colonias de células madre de pluripotencia inducida (iPSCs, *induced pluripotent stem*

## RESULTADOS

cells) positivas para la tinción fosfatasa alcalina (AP, *alkaline phosphatase*) (**Figura 1A**).

Quisimos comprobar si este efecto se producía también empleando un sistema alternativo de reprogramación *in vitro*. Para ello empleamos MEFs derivados del ratón transgénico reprogramable (i4F-MEFs) (Abad et al., 2013). En este caso la transducción con HrasV12 o con el control GFP se realizó previamente a la administración de doxiciclina, el análogo de tetraciclina que emplearemos como inductor para desencadenar la expresión del casete transgénico OSKM. De nuevo, observamos cómo la expresión de HrasV12 provoca un aumento en la eficiencia del proceso (**Figura 1B**).

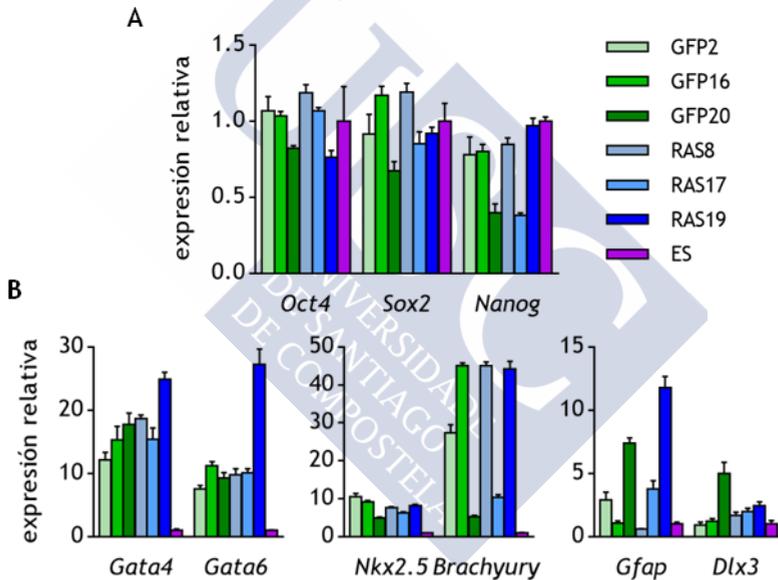


**Figura 1. Efecto de Ras oncogénico sobre la eficiencia de reprogramación celular.** (A) Tinción AP de MEFs wt con los factores OSKM combinados con GFP (arriba) o con HrasV12 (abajo) y cuantificación de la eficiencia de reprogramación relativa al control con GFP (derecha). (B) Tinción AP de MEFs i4F que sobreexpresan GFP (arriba) o HrasV12 (abajo) y cuantificación de la eficiencia de reprogramación relativa al control con GFP (derecha). La significación estadística se analizó mediante el test *t de student* de dos colas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; n.s. no significativo.

Para caracterizar la pluripotencia de las células resultantes hemos picado y expandido, en condiciones de cultivo adecuadas para el crecimiento de células madre, colonias individuales derivadas de la reprogramación de MEFs wt con los factores OSKM retrovirales combinados con HrasV12 o de la reprogramación control con GFP.

Analizamos tres clones de cada una de las condiciones (GFP2, GFP16, GFP20 y RAS8, RAS17, RAS19).

Cuantificamos primero los niveles de mRNA de los genes de pluripotencia endógenos *Oct4*, *Sox2* y *Nanog* mediante qRT-PCR como criterio de pluripotencialidad de nuestros clones. Como control positivo empleamos mRNA de células madre embrionarias (ES, *Embryonic Stem*) (**Figura 2A**). No encontramos diferencias en los niveles de expresión de los genes de pluripotencia ensayados entre los clones GFP y los clones con HrasV12, siendo todos ellos positivos para los marcadores analizados y mostrando niveles de expresión similares a los detectados en las ES.



**Figura 2. Caracterización de las iPSCs con HrasV12.** (A) Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de expresión de mRNA de los genes de pluripotencia endógenos *Oct4*, *Sox2* y *Nanog* en tres clones de iPSCs con GFP (GFP2, GFP16, GFP20) y tres clones con HrasV12 (RAS8, RAS17, RAS19). Los valores están relativizados frente a los niveles de expresión obtenidos en células ES, empleadas como control positivo. (B) Análisis por qRT-PCR de los niveles de expresión de mRNA de los genes de diferenciación específicos de las tres capas embrionarias: endodermo (*Gata4*, *Gata6*), mesodermo (*Nkx2.5*, *Brachyury*), ectodermo (*Gfap*, *Dlx3*); en los cuerpos embrioides derivados de los clones con GFP o HrasV12. Los valores están relativizados frente a los niveles de expresión obtenidos en las células ES, empleadas como control negativo.

## RESULTADOS

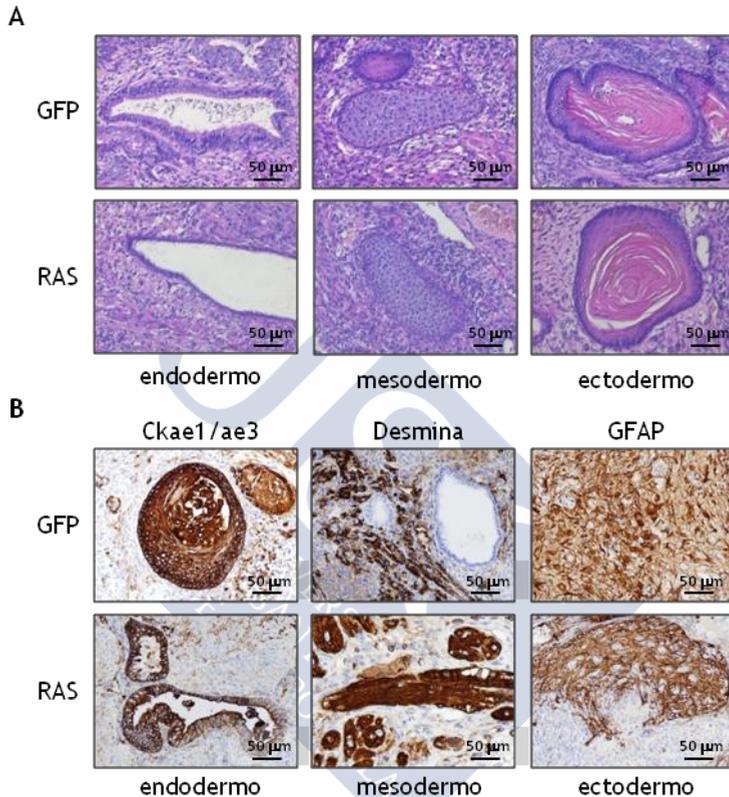
A continuación, testamos la capacidad de diferenciación de estas iPSCs *in vitro* mediante un protocolo de formación de cuerpos embrioides (EBs, *Embryoid Bodies*), que consiste en inducir la formación de agregados celulares mediante la técnica de *hanging drop* o gota colgante. Al mantener estos agregados en condiciones de cultivo no adherentes y en presencia de suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*) favorecemos la diferenciación espontánea a tejidos derivados de las tres capas embrionarias (endo-, meso- y ectodermo). Tras observar signos de esta diferenciación en cultivo, como es la aparición de actividad contráctil resultado de la diferenciación a cardiomiocitos, analizamos mediante qRT-PCR los niveles de expresión de mRNA de marcadores de diferenciación de las tres capas embrionarias: endodermo (*Gata4*, *Gata6*), mesodermo (*Nkx2.5*, *Brachyury*) y ectodermo (*Gfap*, *Dlx3*) (**Figura 2B**). Todos los clones analizados expresan a niveles similares los marcadores mencionados, lo que indica una correcta diferenciación.

Por último, testamos la capacidad de estos clones de iPSCs de diferenciarse *in vivo*. Para ello inyectamos estas células en el riñón de ratones de la cepa C57BL/6, la misma de la que procedían los MEFs parentales para evitar el rechazo de la respuesta inmune, y observamos la aparición de teratomas, tumores benignos con representación de estructuras derivadas de las tres capas embrionarias (Cao et al., 2007), que analizamos histológicamente mediante la tinción con hematoxilina eosina (H&E) (**Figura 3A**) y el análisis inmunohistoquímico con marcadores específicos de las tres capas embrionarias: endodermo (Ck1/ae3), mesodermo (Desmina) y ectodermo (*Gfap*) (**Figura 3B**).

Estos resultados indican que la expresión de HrasV12 durante la reprogramación provoca un aumento de la eficiencia del proceso dando lugar a verdaderas iPSC.

Dado que la familia de proteínas Ras está compuesta por distintos miembros, quisimos comprobar si este efecto estaba restringido a Hras o si la expresión de los demás miembros de la familia tenía el mismo efecto sobre la eficiencia de reprogramación. Además, las proteínas Ras wt alternan entre sus dos posibles conformaciones, activa o

inactiva, mientras que el mutante oncogénico G12V permanece activo de forma constitutiva, por lo que quisimos comprobar si el efecto sobre reprogramación se daba en ambas situaciones o era derivado de la actividad oncogénica.

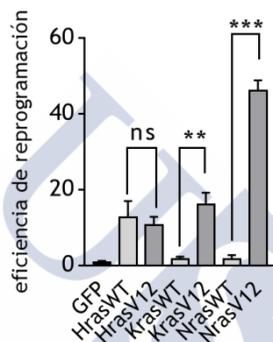


**Figura 3. Análisis histológico de los teratomas derivados de las iPSC con HrasV12. (A)** Imágenes representativas de secciones teñidas para hematoxilina eosina (H&E) de los teratomas derivados de la inyección en riñón de los clones con GFP o HrasV12. Se muestran estructuras derivadas de las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo. **(B)** Imágenes representativas de secciones teñidas para marcadores de las tres capas embrionarias: endodermo (Ck ae1/ae3), mesodermo (Desmina) y ectodermo (Gfap); de los teratomas derivados de la inyección en riñón de los clones con GFP o HrasV12.

Expresamos los distintos miembros de la familia Ras: Hras, Kras y Nras en sus formas wt o mutante oncogénico (G12V) en i4F-MEFs que a continuación sometimos a un proceso de reprogramación

## RESULTADOS

celular. En el caso de Hras observamos que tanto la versión wt como el mutante G12V provocan un aumento en la eficiencia de reprogramación respecto al control con GFP. Sin embargo, entre ambas formas no parecen existir diferencias. En el caso de Kras y Nras, el aumento de eficiencia se produce exclusivamente en el mutante oncogénicamente activo (**Figura 4**). El aumento producido por NrasV12 es mucho más pronunciado, por ello, en algunos de los siguientes experimentos se empleará esta forma.



**Figura 4. Efecto de los distintos miembros de la familia Ras sobre la eficiencia de reprogramación.** Cuantificación de la eficiencia de reprogramación relativa al control con GFP de MEFs i4F que sobreexpresan Hras, Kras o Nras en su forma wt o mutante oncogénico G12V (V12) activo. La significación estadística se analizó mediante el test *t* de student de dos colas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; n.s. no significativo.

Estos resultados indican que la sobreexpresión de Ras oncogénico durante el proceso de reprogramación produce un aumento de la eficiencia del proceso, sin afectar a la calidad de las iPSC resultantes. Este efecto ocurre con distintos miembros de la familia Ras y está asociado con la forma mutante activa oncogénicamente.

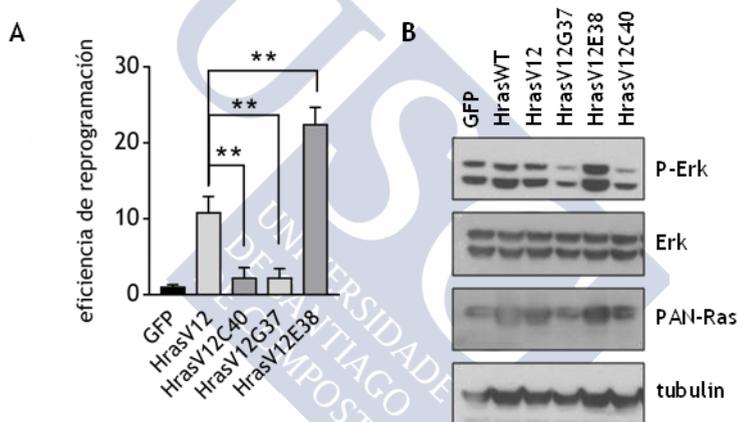
### ***1.1.2. La vía MAPK/ERK es la responsable del efecto de Ras sobre reprogramación***

Las proteínas de la familia Ras pueden activar numerosas vías de señalización implicadas en distintos procesos biológicos dentro de la célula. Para profundizar en el estudio del efecto de Ras sobre el proceso de reprogramación celular quisimos diseccionar las vías por

debajo de Ras y determinar cuál es la responsable del efecto observado.

Empleamos distintas estrategias experimentales para abordar esta cuestión, como son el uso de plásmidos mutantes y el uso de inhibidores químicos.

El primer paso ha sido el uso de plásmidos de HrasV12 con mutaciones puntuales específicas que provocan la activación preferente de una de las vías por debajo de Ras y no de las otras. Estos mutantes son: HrasV12C40, que activa la vía de PI3K; HrasV12G37, que activa la vía Ral-GDS; y HrasV12E38 que activa la vía MAPK/ERK (Rodríguez-Viciano et al., 1997).



**Figura 5. Disección de las vías por debajo de Ras: Plásmidos mutantes.** (A) Cuantificación de la eficiencia de reprogramación relativa al control con GFP de MEFs i4F que sobreexpresan HrasV12 o los distintos mutantes que activan específicamente cada una de las vías por debajo de Ras: HrasV12C40, vía PI3K; HrasV12G37, vía RalGDS; y HrasV12E38, vía MAPK/ERK. (B) Análisis por *Western blot* de los niveles proteicos de Ras (PAN-Ras), P-Erk y Erk en MEFs i4F que sobreexpresan cada uno de los plásmidos de Ras: Hras wt, HrasV12 o los distintos mutantes. Se incluyen MEFs que sobreexpresan GFP como control y tubulina como control de carga. La significación estadística se analizó mediante el test *t de student* de dos colas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; n.s. no significativo.

Llevamos a cabo la reprogramación de i4F-MEFs en los que sobreexpresamos mediante transducción retroviral cada uno de estos plásmidos. Observamos como los mutantes G37 y C40 no tienen efecto sobre la eficiencia de reprogramación si los comparamos con el

## RESULTADOS

control con GFP. Sin embargo, cuando se trata del mutante E38, se produce un aumento de eficiencia incluso mayor que con HrasV12 (**Figura 5A**).

Recogimos extractos proteicos de los i4F-MEFs que expresan las distintas formas mutantes de Hras y los analizamos mediante *Western blot* para estudiar la sobreexpresión de Ras y la activación de la vía MAPK/ERK, medida como los niveles de Erk fosforilado (P-Erk) respecto a los niveles totales de Erk (**Figura 5B**). Las células transducidas con HrasV12E38 muestran los niveles más altos de P-Erk, indicativos de una mayor activación de la vía MAPK/ERK, como cabía esperar.

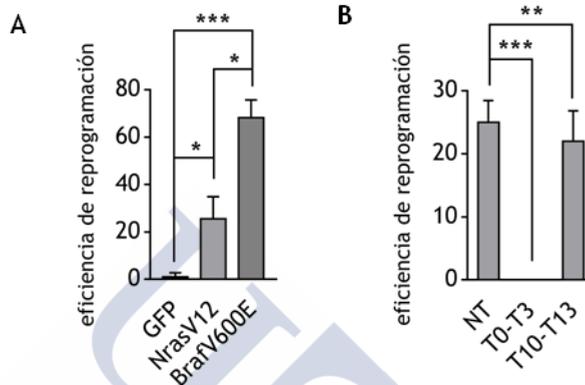
Para confirmar que la vía MAPK/ERK es la responsable del efecto de HrasV12 sobre reprogramación nos planteamos modularla.

Sobreexpresamos Braf, uno de los 3 miembros de la familia Raf, el efector inmediatamente por debajo de Ras en la vía de MAPK/ERK. Al igual que con Ras, escogimos un mutante oncogénico, el BrafV600E que presenta la sustitución de una valina (V) por ácido glutámico (E) en la posición 600, lo que conlleva su activación de manera constitutiva (Davies et al., 2002). Al expresarlo en i4F-MEFs obtuvimos un aumento en la eficiencia de reprogramación, incluso mayor que con la expresión de NrasV12 (**Figura 6A**).

Del mismo modo que activamos la vía MAPK/ERK y conseguimos ver un efecto sobre la eficiencia de reprogramación, probamos qué ocurre cuando inhibimos esta vía. Para ello empleamos un inhibidor selectivo de MEK (Meki, PD0325901), que se une de forma irreversible al dominio de unión de ATP y previene así la fosforilación de la proteína diana (Barrett et al., 2008).

Sobreexpresamos NrasV12 en i4F-MEFs y lo combinamos con el tratamiento a distintos tiempos con el inhibidor de Mek para evaluar la contribución temporal de la sobreexpresión de Ras al aumento de eficiencia de reprogramación. El tratamiento con Meki durante los días 0 a 3 del proceso de reprogramación provoca una disminución drástica de la eficiencia, llegando a bloquear por completo la generación de colonias de iPSC. Sin embargo, cuando el tratamiento

se lleva a cabo durante los últimos días de la reprogramación, días 10 a 13, el efecto es mucho menor y la eficiencia del proceso se mantiene en torno a los mismos valores que en el control no tratado (NT) (Figura 6B).



**Figura 6. Disección de las vías por debajo de Ras: Sobreexpresión de BrafV600E e inhibición de la vía MAPK/ERK. (A)** Cuantificación de la eficiencia de reprogramación relativa al control con GFP de MEFs i4F que sobreexpresan NrasV12 o el efector justo a continuación de Ras en la vía MAPK/ERK, BrafV600E. **(B)** Cuantificación de la eficiencia de reprogramación, relativa al control con GFP, de MEFs i4F que sobreexpresan NrasV12 y que fueron tratados con Meki a distintos tiempos: tiempo inicial (T0-T3), tiempo final (T10-T13) o no tratados (NT). La significación estadística se analizó mediante el test *t* de student de dos colas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; n.s. no significativo.

Estos resultados indican que la vía activada por Ras con implicaciones en la eficiencia de reprogramación celular es la vía MAPK/ERK y que modulándola conseguimos alterar la eficiencia del proceso.

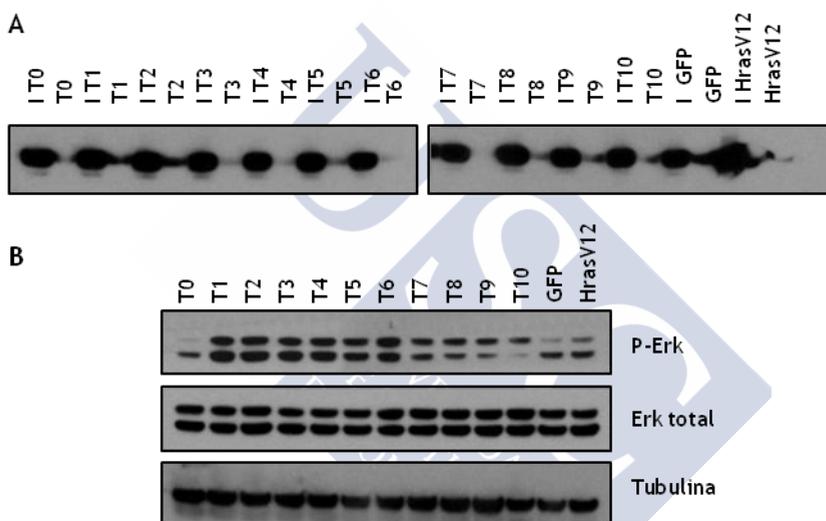
### ***1.1.3. Activación de la vía endógena de Ras durante la reprogramación celular***

Tras observar que la sobreexpresión de Ras oncogénico provoca un aumento de la eficiencia de reprogramación, quisimos estudiar qué ocurre de forma endógena en una reprogramación “estándar”. Para ello llevamos a cabo una reprogramación de MEFs wt con los factores OSKM retrovirales y, a lo largo del proceso, recogimos extractos proteicos a diario desde el día 0 al día 10.

## RESULTADOS

Realizamos un protocolo de precipitación “*pull-down*” con la proteína RalGDS-RBD fusionada a GST (Franke et al., 1997). Este sistema atrapa el Ras que se encuentre unido a GTP, y por lo tanto en estado activo, presente en el extracto proteico, lo que nos permite detectar mediante *Western blot* los niveles de activación de Ras.

El análisis por *Western blot* de las muestras procesadas reveló un incremento en los niveles de Ras activo durante los tres primeros días del proceso y el descenso de los niveles de activación en los siguientes días (**Figura 7A**).

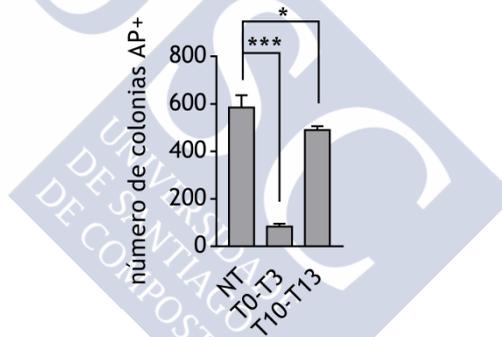


**Figura 7. Activación de Ras endógeno durante una reprogramación “estándar”.** (A) *Pull-down* con la proteína RalGDS-RBD fusionada a GST para determinar los niveles de Ras activo presente en los extractos proteicos durante reprogramación de MEFs wt con OSKM a distintos tiempos (T1-T10). Como control se cargó el *input* correspondiente a cada punto temporal (I T1- I T10). La detección se realizó mediante *Western blot* empleando un anticuerpo frente a PAN-Ras. Como control se realizó un *pull-down* en paralelo de MEFs wt que sobreexpresan HrasV12 o GFP. (B) *Western blot* de los extractos recogidos durante la reprogramación y de los MEFs wt que sobreexpresan HrasV12 o GFP como control. Se analizaron los niveles de P-Erk y Erk total, y de tubulina como control de carga.

Determinamos también la activación de la vía MAPK/ERK durante la reprogramación mediante el análisis por *Western blot* de los niveles de P-Erk respecto al Erk total (**Figura 7B**). Observamos un rápido incremento de los niveles de P-Erk en el primer día del proceso

(T1). Estos niveles se mantienen elevados hasta el día seis, momento a partir del cual disminuyen.

Tras observar que durante la reprogramación se produce la activación de Ras endógeno y de la vía MAPK/ERK, nos planteamos estudiar el efecto del uso de Meki, el inhibidor empleado anteriormente, sobre una reprogramación sin sobreexpresión de Ras. Introducimos los factores de reprogramación OSKM mediante vectores retrovirales en MEFs wt y tratamos este cultivo con el inhibidor durante 3 días, al inicio o al final del proceso, de manera análoga a como lo realizamos con anterioridad. Observamos que el número de colonias de iPSCs obtenidas disminuye drásticamente cuando el tratamiento se administra durante los días iniciales y, sin embargo, cuando se trata en la etapa final del proceso el efecto es mucho más moderado (**Figura 8**).



**Figura 8.** Inhibición de la vía MAPK/ERK durante una reprogramación “estándar”. Cuantificación del número de colonias positivas para la tinción AP en MEFs wt con OSKM retroviral y tratados con Meki a distintos tiempos: tiempo inicial (T0-T3), tiempo final (T10-T13) o no tratados (NT). La significación estadística se analizó mediante el test *t de student* de dos colas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; n.s. no significativo.

Estos resultados indican que la activación de Ras y de la vía MAPK/ERK se produce de manera endógena en las células durante el inicio del proceso de reprogramación y parece esencial para la obtención de iPSC.

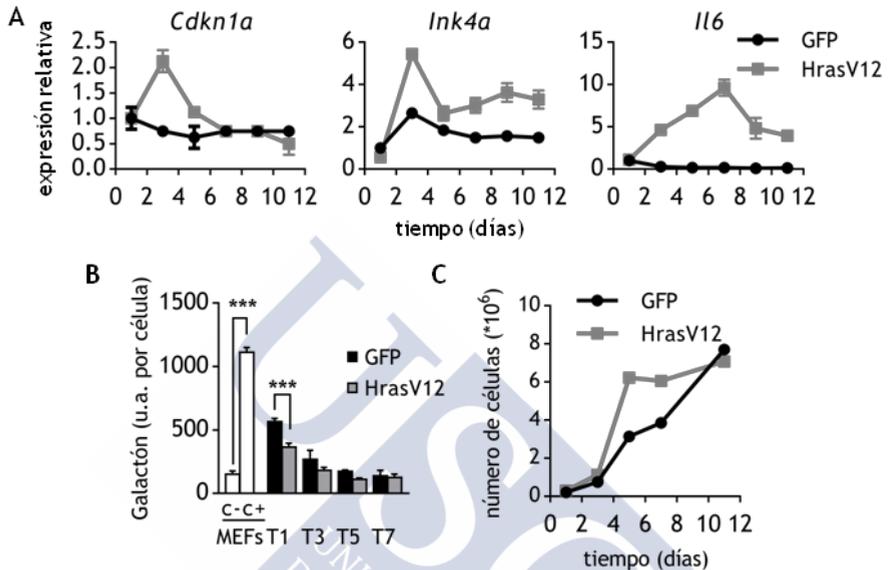
### ***1.1.4. Senescencia durante la reprogramación con Ras***

Teniendo en cuenta que la expresión de HrasV12 sobre células primarias lleva a la entrada en senescencia inducida por oncogén (OIS, *Oncogene-Induced Senescence*) (Serrano et al., 1997) y que la senescencia celular constituye una barrera para la obtención de células iPS (Banito et al., 2009), decidimos analizar la expresión de genes relacionados con la senescencia a lo largo del proceso de reprogramación con sobreexpresión de HrasV12.

Analizamos los niveles de expresión de los inhibidores del ciclo celular *Cdkn1a* y *Ink4a*, que actúan como barrera para la obtención de iPSC (Banito et al., 2009; Kawamura et al., 2009; Li et al., 2009; Utikal et al., 2009a), así como de la citoquina *Il6*, un componente del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, *Senescence-Associated Secretory Phenotype*) con efectos descritos favoreciendo la reprogramación celular (Brady et al., 2013; Mosteiro et al., 2016) (**Figura 9A**). Tanto *Cdkn1a* como *Ink4a* muestran un patrón similar en la reprogramación con HrasV12, con un pico de expresión en el día 3 del proceso seguido de una bajada posterior. En el caso de *Ink4a* el incremento en los niveles de expresión en los primeros días se produce también en la reprogramación control con GFP, aunque a menor escala. En cuanto a *Il6* los niveles de expresión son mayores en la reprogramación con HrasV12, produciéndose un aumento paulatino hasta el día 7, momento en el que se alcanza el nivel más alto y a partir del cual comienzan a descender.

Quisimos profundizar en el estudio de la senescencia celular durante reprogramación y para ello estudiamos la actividad enzimática  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ -Gal, *Senescence Associated  $\beta$ -galactosidase*) mediante el empleo de un sustrato quimioluminiscente, galactón, durante los siete primeros días del proceso (**Figura 9B**). Solo encontramos diferencias entre las células con HrasV12 y las células con GFP en el primer punto analizado (día 1), siendo los valores obtenidos para HrasV12 inferiores. Este resultado concuerda con una mayor proliferación de estas células, determinada mediante el conteo manual con cámara de *Neubauer* del número total de células en una y otra condición (**Figura 9C**). Durante

la reprogramación con HrasV12 se produce una hiperproliferación al inicio, mientras que el número de células a tiempo final, tras doce días en cultivo, se iguala con el número de células de la condición control con GFP.



**Figura 9. Senescencia durante el proceso de reprogramación con sobreexpresión de Ras oncogénico. (A)** Análisis por qRT-PCR de la expresión de mRNA de los inhibidores del ciclo celular *Cdkn1a* e *Ink4a* y de la citoquina componente del SASP, *Il6*. Los niveles se determinaron cada 48 horas a lo largo de todo el proceso de reprogramación de MEFs wt con OSKM y sobreexpresión de HrasV12 o GFP como control. Los valores se relativizaron frente al nivel de expresión de las células con GFP a día 1. **(B)** Análisis de la actividad SA-β-Gal, mediante el uso de Galactón, durante la reprogramación de MEFs wt con OSKM combinado con HrasV12 o GFP. Como control negativo empleamos MEFs wt en pase temprano y como control positivo MEFs wt en pase tardío (senescencia por pases seriados). Los valores de la actividad SA-β-Gal expresados en unidades arbitrarias (u.a.) son relativos al número de células. **(C)** Proliferación durante la reprogramación de MEFs wt con los factores OSKM combinados con GFP o HrasV12, cuantificada como número total de células cada 48 horas. La significación estadística se analizó mediante el test *t de student* de dos colas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; n.s. no significativo.

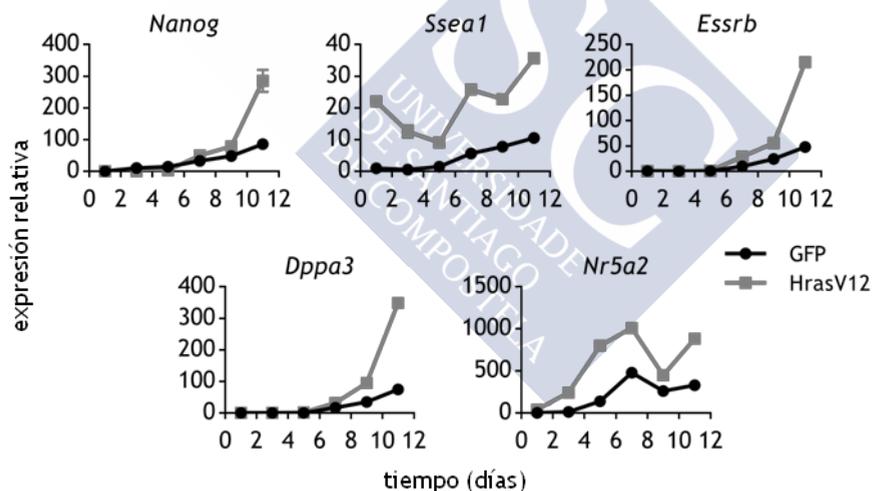
Por tanto, a pesar de que el análisis de la expresión génica revela que en la reprogramación con HrasV12 existen niveles superiores de genes relacionados con senescencia, las células muestran una mayor proliferación inicial y una menor o igual entrada en senescencia a lo largo del proceso.

## RESULTADOS

### ***1.1.5. Cambios en la dinámica del proceso de reprogramación provocados por la expresión de Ras oncogénico***

Una vez que definimos qué vía es la responsable del efecto de Ras sobre la eficiencia de reprogramación, quisimos estudiar cómo afectaba la expresión de Ras oncogénico a la dinámica de generación de iPSC. Para que se produzca una reprogramación exitosa se requiere la activación de los genes clave de pluripotencia endógenos, así como el silenciamiento de genes propios del estado diferenciado (Polo et al., 2012).

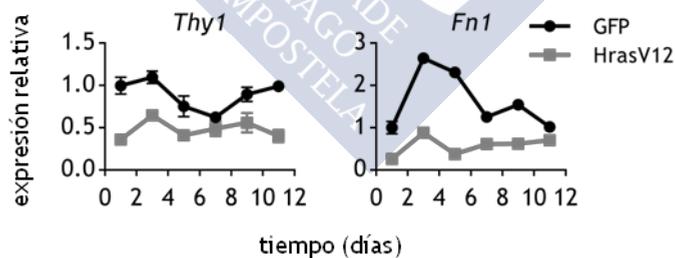
Llevamos a cabo una reprogramación de MEFs wt en los que expresamos mediante transducción retroviral los factores OSKM combinados con la expresión de HrasV12 o GFP como control. A lo largo de todo el proceso recogimos extractos de RNA cada 48 horas en los que analizamos los niveles de expresión de distintos genes mediante qRT-PCR.



**Figura 10. Dinámicas del proceso de reprogramación con sobreexpresión de Ras oncogénico: genes de pluripotencia.** Análisis por qRT-PCR de la expresión de mRNA de los genes de pluripotencia: *Nanog*, *Ssea1*, *Essrb*, *Dppa3* y *Nr5a2*. Los niveles se determinaron cada 48 horas a lo largo de todo el proceso de reprogramación de MEFs wt con OSKM y sobreexpresión de HrasV12, o GFP como control. Los valores se relativizaron frente al nivel de las células con GFP a día 1.

Comenzamos analizando los niveles de expresión de varios genes clave relacionados con la pluripotencia: *Nanog*, *Ssea1*, *Essrb*, *Dppa3* y *Nr5a2* (**Figura 10**). Encontramos que todos los genes analizados comienzan a expresarse de manera más temprana en la reprogramación con HrasV12 y los niveles alcanzados son superiores a los alcanzados con GFP. De los genes analizados cabe destacar que *Ssea1* presenta, ya a día uno, un nivel mucho mayor en la reprogramación con HrasV12 y que estos niveles se mantienen elevados a lo largo del proceso.

Como ya mencionamos, una reprogramación exitosa requiere, además de la expresión de genes de pluripotencia endógenos, el silenciamiento de los genes somáticos característicos del estado diferenciado de las células parentales. En nuestro caso las células parentales son MEFs, por lo que estudiamos los niveles de expresión de genes de identidad mesenquimal, propios de los fibroblastos: *Thy1* y *Fn1* (**Figura 11**). Para ambos, los niveles de expresión durante todo el proceso son inferiores en las células con HrasV12 que en la reprogramación control, con GFP. De nuevo, de modo similar a lo que ocurría con *Ssea1*, encontramos diferencias en los niveles de expresión de partida, siendo en este caso la expresión inferior en las células con HrasV12.



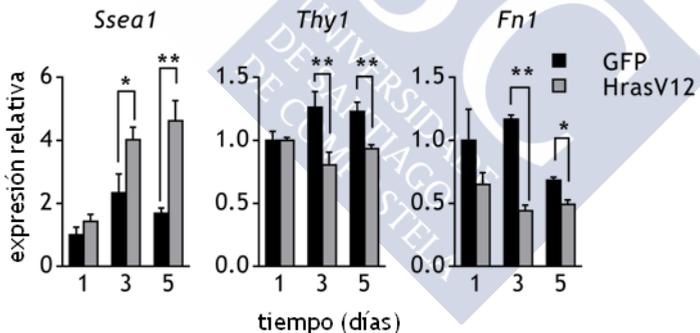
**Figura 11. Dinámicas del proceso de reprogramación con sobreexpresión de Ras oncogénico: genes de identidad celular.** Análisis por qRT-PCR de la expresión de mRNA de los genes de identidad celular propios de fibroblastos: *Thy1* y *Fn1*. Los niveles se determinaron cada 48 horas a lo largo de todo el proceso de reprogramación de MEFs wt con OSKM y sobreexpresión de HrasV12 o GFP como control. Los valores se relativizaron frente al nivel de las células con GFP a día 1.

## RESULTADOS

### ***1.1.6. Cambios en la expresión génica inducidos por Ras oncogénico de manera independiente de OSKM***

Basándonos en los resultados obtenidos analizando las dinámicas de reprogramación y en la observación de que alguno de los genes estudiados presentaba diferencias significativas ya a día uno, quisimos ver si la expresión de HrasV12 por sí sola, sin combinarla con los factores de reprogramación, tiene algún efecto sobre la expresión de los genes de pluripotencia e identidad celular analizados anteriormente.

Para ello sobreexpresamos HrasV12 en MEFs wt que mantuvimos en las condiciones de cultivo apropiadas para la reprogramación celular y analizamos mediante qRT-PCR la expresión de mRNA cada 48 horas. En paralelo, analizamos los niveles de expresión en MEFs wt en los que expresamos GFP como control. Seleccionamos para su estudio los genes que presentaban cambios más evidentes en el estadio inicial en el experimento anterior, el marcador de pluripotencia *Ssea1* y los marcadores de identidad celular *Thy1* y *Fn1* (**Figura 12**).



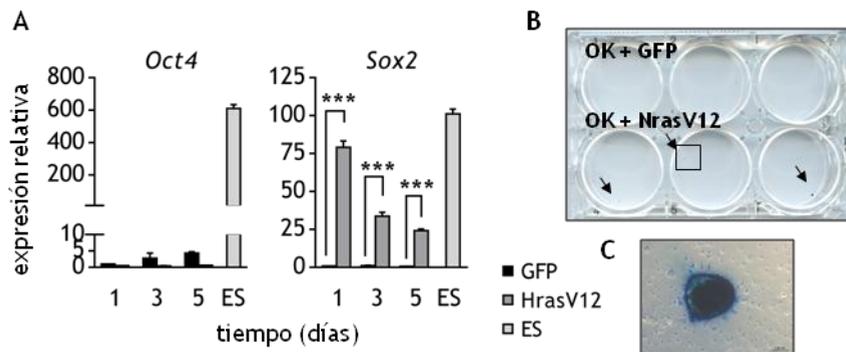
**Figura 12. Cambios de expresión inducidos por la sobreexpresión de Ras oncogénico independientes de OSKM: genes de pluripotencia e identidad celular.** Análisis por qRT-PCR de la expresión de mRNA del gen de pluripotencia *Ssea1* y de los genes de identidad celular propios de fibroblastos: *Thy1* y *Fn1*, en MEFs wt que sobreexpresan HrasV12 o GFP como control y que fueron mantenidos en medio de reprogramación. Los niveles se determinaron tras 1, 3 y 5 días desde la sobreexpresión y se relativizaron frente al nivel de los MEFs wt con GFP a día 1. La significación estadística se analizó mediante el test *t de student* de dos colas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; n.s. no significativo.

Observamos que el marcador de pluripotencia *Ssea1* se expresa a niveles más altos en las células con HrasV12 que en las células con GFP, siendo esta diferencia significativa a tres y cinco días tras la sobreexpresión. Los dos marcadores de identidad celular analizados, *Thy1* y *Fnl1*, presentan también diferencias significativas entre las células con GFP y las células con HrasV12, teniendo estas últimas, niveles significativamente inferiores a días tres y cinco.

Estos resultados nos indican que la expresión de HrasV12 en ausencia de los factores de reprogramación provoca cambios en la expresión de genes de pluripotencia, como *Ssea1*, y genes de identidad celular, como *Thy1* y *Fnl1*, similares a los que se producen durante reprogramación cuando se combina con los factores OSKM.

Decidimos además analizar los niveles de expresión de los factores de reprogramación *Oct4* y *Sox2* endógenos en estos MEFs y, sorprendentemente, encontramos que la expresión de HrasV12 induce de manera transitoria la expresión de *Sox2*, mientras que *Oct4* no presenta niveles detectables (**Figura 13A**). El alto nivel de *Sox2* en las células que sobreexpresan HrasV12 nos hizo plantearnos si la expresión de Ras permitiría la reprogramación en ausencia de *Sox2* exógeno. Llevamos a cabo un experimento de reprogramación en MEFs wt en los que expresamos los factores *Oct4* y *Klf4* (OK) combinados con HrasV12 o con GFP como control (**Figura 13B**). Como era de esperar, en la condición OK+GFP, no obtuvimos ninguna colonia de iPSC tras cuatro semanas en cultivo. Sin embargo, en la condición OK+HrasV12 obtuvimos una colonia positiva para la tinción fosfatasa alcalina y con la morfología propia de iPSC en cada pocillo de la placa (**Figura 13C**). Sería necesario realizar la caracterización completa de estas células para comprobar que se trata de verdaderas iPSCs pero este resultado preliminar indica que la desregulación en la expresión de *Sox2* tras la sobreexpresión de Ras oncogénico es suficiente para permitir la reprogramación sin *Sox2* exógeno aunque con una eficiencia muy baja.

## RESULTADOS



**Figura 13. Cambios de expresión inducidos por la sobreexpresión de Ras oncogénico independientes de OSKM: factores de reprogramación. (A)** Análisis por qRT-PCR de la expresión de mRNA de los genes *Oct4* y *Sox2* endógenos en MEFs wt que sobreexpresan HrasV12 o GFP como control y que fueron mantenidos en medio de reprogramación. Los niveles se determinaron tras 1, 3 y 5 días desde la sobreexpresión y se relativizaron frente al nivel de los MEFs wt con GFP a día 1. Como control positivo se muestran los niveles de estos genes en células ES. **(B)** Tinción AP de MEFs wt con los factores *Oct4* y *Klf4* (OK) combinados con NrasV12 o con GFP como control. Las flechas señalan las colonias positivas para la tinción AP en la condición OK + NrasV12. **(C)** Imagen representativa de una colonia de iPSC de la condición OK + NrasV12 con tinción AP. La significación estadística se analizó mediante el test *t* de *student* de dos colas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; n.s. no significativo.

### ***1.1.7. El efecto de Ras sobre reprogramación es extrínseco a la célula***

Quisimos saber si el efecto de Ras sobre reprogramación era intrínseco a la propia célula que expresaba Ras oncogénico, o si por el contrario era un efecto extrínseco y las células que expresan Ras oncogénico favorecen de alguna manera la reprogramación de las células vecinas.

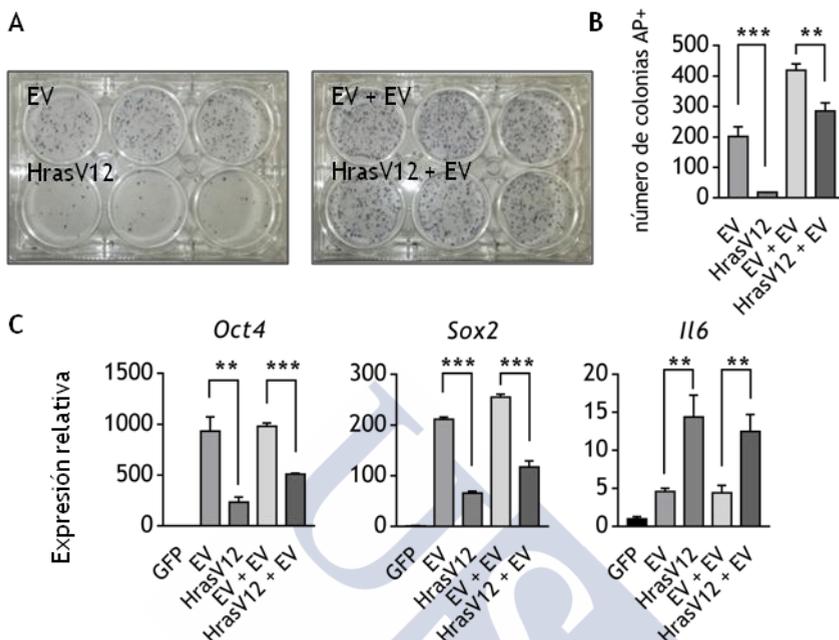
Para abordar la cuestión de si el efecto favorecedor de la reprogramación ocurre en la propia célula que sobreexpresa Ras oncogénico empleamos una combinación de distintos vectores lentivirales inducibles en MEFs wt. Por un lado, introducimos los factores de reprogramación OSKM en un vector lentiviral inducible por tetraciclina (Tet-O-FUW-OSKM) que necesita, para poder responder al inductor, la expresión simultánea del transactivador reverso dependiente de tetraciclina (rtTA). Por otro lado, la expresión

de Ras oncogénico procede de otro vector lentiviral inducible por tetraciclina (pInducer20-HrasV12) que presenta en el mismo vector el rtTA. La combinación del plásmido OSKM inducible con el inducible de HrasV12 o con su vector vacío (pInducer20-EV, *empty vector*) como control va a hacer que solo las células que expresen HrasV12 o EV tengan el rtTA necesario para inducir la expresión de OSKM. Tras añadir el análogo de la tetraciclina, doxíciclina, a estas células y someterlas al proceso de reprogramación celular, observamos que las células con HrasV12 se reprograman con una eficiencia muy inferior a las células con el vector vacío. Sin embargo, si a ambas condiciones les añadimos una copia extra del vector vacío de modo que coexistan en el cultivo células expresando sólo los factores OSKM y células expresando los factores OSKM y HrasV12, recuperamos en parte la capacidad de formación de colonias de iPSC, aunque con una eficiencia ligeramente inferior a la condición control con doble dosis del plásmido control (EV) (**Figura 14A-B**).

Analizamos los niveles de expresión de *Oct4* y *Sox2* tras 72 horas de inducción con doxíciclina y observamos como en la condición OSKM + HrasV12 los niveles son inferiores que en la condición control y como tras la adición de una dosis extra de rtTA procedente del vector vacío los niveles sufren un pequeño incremento, aunque sin llegar a alcanzar los niveles obtenidos en el control. Analizamos también los niveles de expresión de *Il6*, una citoquina asociada al SASP y que favorece el proceso de reprogramación de forma paracrina. Observamos que en las células con sobreexpresión de HrasV12 los niveles de *Il6* son mayores que en el control. Sin embargo, al carecer de células con los factores de reprogramación y sin HrasV12 sobre las que ejercer su efecto, no favorece la reprogramación. En el caso de la reprogramación con un rtTA extra, los niveles de *Il6* con HrasV12 (HrasV2+EV) son mayores que en el control (EV+EV) y permiten que se produzca una reprogramación más eficiente (**Figura 14C**).

Estos resultados nos indican que el efecto de Ras oncogénico favoreciendo el proceso de reprogramación no es intrínseco, sino que debe ser mediado por factores producidos por estas células y que afectan a las células del entorno.

## RESULTADOS

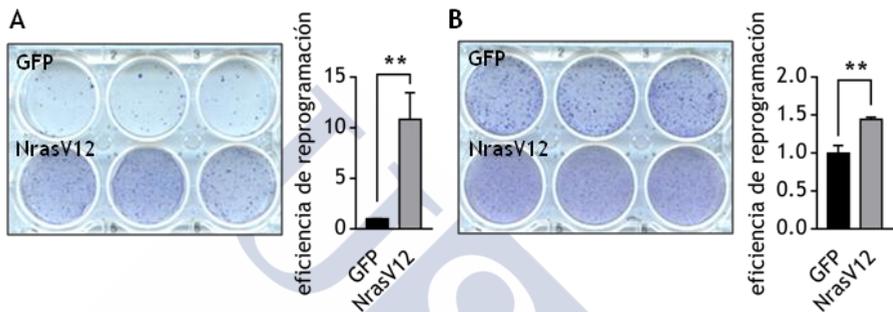


**Figura 14. Análisis del efecto intrínseco de HrasV12 sobre reprogramación.** (A) Tinción AP de MEFs wt transducidos con Tet-O-FUW-OSKM combinado con el plásmido inducible por doxiciclina de HrasV12 (HrasV12) o el vector vacío (EV) (placa izquierda) o ambas condiciones con una copia extra del vector vacío: HrasV12 + EV o EV+EV (placa derecha). (B) Cuantificación del número de colonias positivas para la tinción AP en cada una de las condiciones. (C) Análisis por qRT-PCR de la expresión de mRNA de los factores de reprogramación *Oct4* y *Sox2* y de la citoquina *Il6* en cada una de las condiciones. Los valores se relativizaron frente a los niveles obtenidos en MEFs transducidos con GFP como control negativo. La significación estadística se analizó mediante el test *t de student* de dos colas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; n.s. no significativo.

Para corroborar esta observación, realizamos experimentos de cocultivo y de tratamiento con medios condicionados durante reprogramación.

Realizamos el cocultivo de i4F-MEFs con MEFs wt transducidos con NrasV12 o con GFP como control, y llevamos a cabo una reprogramación tras la cual realizamos una tinción fosfatasa alcalina para cuantificar la eficiencia del proceso. La eficiencia de reprogramación obtenida en el caso de los i4F-MEFs cocultivados con MEFs wt que expresan NrasV12 fue 10 veces superior a la obtenida en el control (**Figura 15A**).

Realizamos también un experimento de reprogramación de i4F-MEFs sobre el que ensayamos el efecto de medios condicionados por MEFs wt que expresan NrasV12 o GFP. A lo largo de todo el proceso de reprogramación añadimos medio condicionado por estos MEFs wt y obtuvimos un resultado en la misma línea que el anterior, en el que la eficiencia de reprogramación de los MEFs i4F es mayor cuando se tratan con medio condicionado por células que expresan Ras oncogénico (**Figura 15B**).



**Figura 15. Estudio del efecto extrínseco de NrasV12 sobre reprogramación.** (A) Tinción AP de MEFs i4F cocultivos con MEFs wt que sobreexpresan GFP (arriba) o NrasV12 (abajo) y cuantificación de la eficiencia de reprogramación relativa a la condición control. (B) Tinción AP de MEFs i4F tratados durante la reprogramación con medios condicionados por MEFs wt que expresan GFP (arriba) o NrasV12 (abajo) y cuantificación de la eficiencia de reprogramación relativa a la condición control. La significación estadística se analizó mediante el test *t de student* de dos colas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; n.s. no significativo.

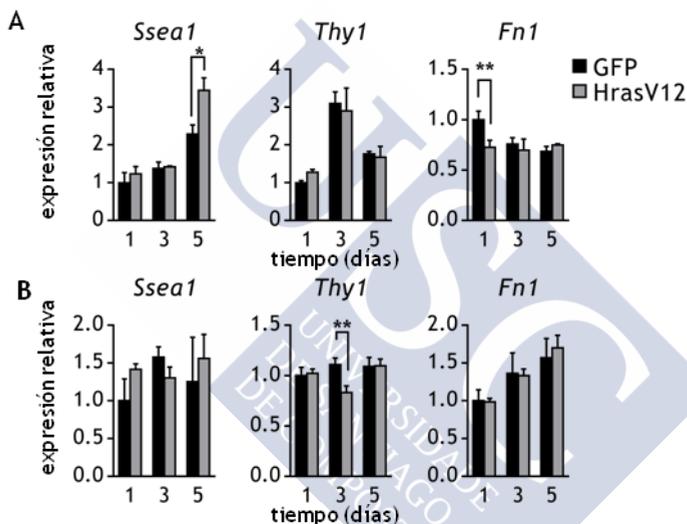
Estos resultados apuntan a que el efecto de Ras sobre la reprogramación celular es extrínseco y se encuentra mediado, al menos en parte, por algún factor soluble secretado por estas células y que afecta a las demás células del cultivo.

Teniendo en cuenta esta observación y los resultados previos que indican que Ras por sí solo tiene efectos sobre el patrón de expresión de las células, alterando genes de pluripotencia y de identidad celular, quisimos evaluar si estos factores secretados por células que expresan Ras oncogénico provocan los mismos cambios en las células diana.

Para ello llevamos a cabo de nuevo experimentos de cocultivo y de medios condicionados sobre MEFs wt en los que analizamos los niveles de expresión de mRNA del gen de pluripotencia *Ssea1* y de los genes de identidad celular *Thy* y *Fnl* a distintos tiempos.

## RESULTADOS

Para realizar el cocultivo empleamos un sistema de *transwell* en el que sembramos las células que expresan HrasV12 o GFP en el *transwell* y los MEFs diana en el fondo del pocillo en el que se coloca el dispositivo. El análisis mediante qRT-PCR de los niveles de mRNA de *Ssea1*, *Thy1* y *Fn1* en los MEFs diana a días 1, 3 y 5 reveló cambios significativos. A día 5, los niveles del marcador de pluripotencia *Ssea1* se incrementan en los MEFs cocultivados con HrasV12. A día 1, encontramos la bajada de los niveles de *Fn1* en los MEFs cocultivados con HrasV12 (**Figura 16A**).



**Figura 16.** Efecto paracrina de células sobreexpresando HrasV12 sobre la expresión de genes de pluripotencia e identidad celular. (A) Análisis por qRT-PCR de la expresión de mRNA del gen de pluripotencia *Ssea1* y de los genes de identidad celular propios de fibroblastos: *Thy1* y *Fn1*, en MEFs wt cocultivados en un sistema de *transwell* con MEFs wt que sobreexpresan HrasV12 o GFP durante 1, 3 y 5 días. Los valores están relativizados frente a los niveles de expresión en los MEFs de la condición control a día 1. (B) Análisis por qRT-PCR de la expresión de mRNA del gen de pluripotencia *Ssea1* y de los genes de identidad celular propios de fibroblastos: *Thy1* y *Fn1*, en MEFs wt tratados durante 24 horas con medios condicionados por MEFs wt que sobreexpresan HrasV12 o GFP como control a los días 1, 3 y 5 tras la transducción. Los valores están relativizados frente a los niveles de expresión en los MEFs de la condición control a día 1. La significación estadística se analizó mediante el test *t* de student de dos colas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; n.s. no significativo.

El tratamiento con medios condicionados por células que sobreexpresan Ras es capaz de inducir la bajada significativa en los niveles de expresión de *Thy1* en las células diana a día 5, mientras que en el resto de genes analizados no encontramos diferencias significativas (**Figura 16B**).

Aunque solo encontramos diferencias significativas en algunas de las condiciones analizadas, los cambios observados concuerdan con los resultados obtenidos en los experimentos previos. Estos resultados muestran un efecto extrínseco de las células que expresan Ras oncogénico sobre las células de alrededor alterando el nivel de expresión de ciertos genes relacionados con la adquisición de pluripotencia y la pérdida de identidad celular. Este efecto parece ser mediado en parte por factores solubles.

## **1.2. Efecto de la activación oncogénica sobre la reprogramación *in vivo***

La expresión de los factores de reprogramación *in vivo* en ratones i4F permite la adquisición del estado pluripotente en células de distintos tejidos. Sin embargo, aunque el casete transgénico se expresa en todos los tejidos del ratón, no todos son igual de susceptibles a esta desdiferenciación (Abad et al., 2013). Estudios previos muestran como el daño tisular y la senescencia celular generan un ambiente que facilita la reprogramación en tejidos resistentes (Chiche et al., 2017; Mosteiro et al., 2016). Teniendo en cuenta esto y nuestros resultados previos, que muestran como la sobreexpresión de Ras oncogénico favorece la reprogramación *in vitro*, quisimos comprobar si la activación oncogénica *in vivo* podría favorecer también la reprogramación en tejidos resistentes.

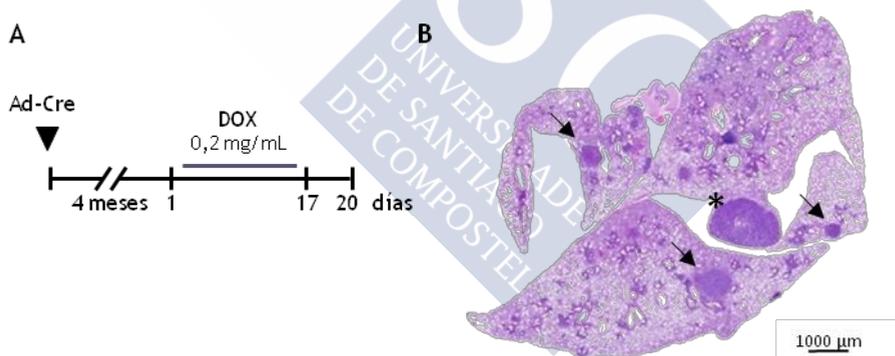
### ***1.2.1. Modelos animales de activación genética de cáncer***

Para estudiar el efecto de la activación oncogénica de manera genéticamente definida empleamos un modelo de ratón transgénico de inicio tumoral basado en el *Knock-In* (KI) de la versión mutante oncogénica *KrasV12* en su propio alelo endógeno. La expresión de *KrasV12* se produce de manera condicional tras su activación mediante el tratamiento con la recombinasa Cre (Guerra et al., 2003).

## RESULTADOS

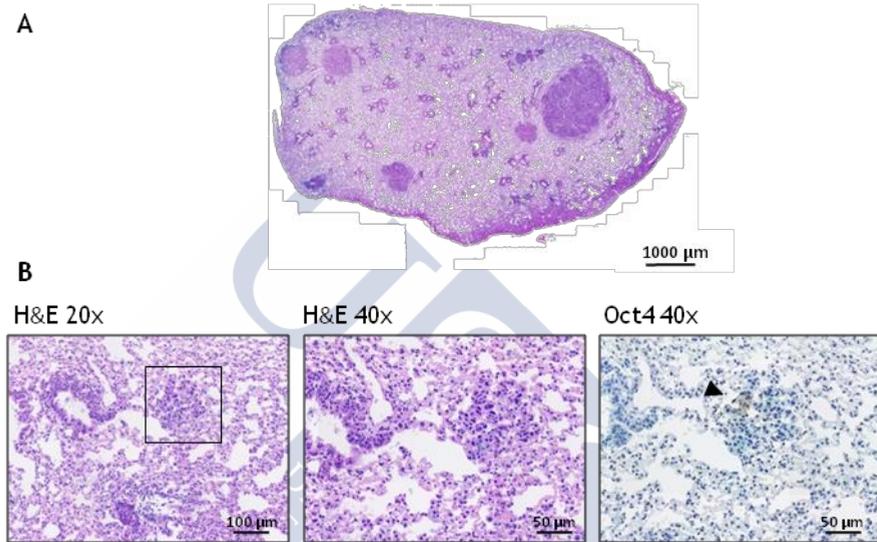
Cruzamos este ratón KrasV12-KI con el ratón reprogramable i4F. Administramos por vía intratraqueal adenovirus que expresan la recombinasa Cre (Ad-Cre) a la descendencia, ratones i4F o i4F/KrasV12, para activar la expresión de KrasV12 específicamente en pulmón. La expresión de KrasV12 en pulmón provoca el desarrollo de adenomas (lesiones premalignas) que pueden llegar a progresar hacia adenocarcinomas malignos (Collado et al., 2005; Guerra et al., 2003).

Cuatro meses después del tratamiento con Ad-Cre, tiempo suficiente para la aparición de adenomas, administramos doxiciclina en el agua de bebida (0,2 mg/mL) durante dos semanas y media. Tras 3 días desde el fin del tratamiento sacrificamos los ratones y analizamos histológicamente los pulmones (**Figura 17A**). El análisis histológico de los pulmones doble transgénicos (i4F/KrasV12) muestra múltiples lesiones de tipo adenoma, que aparecen señaladas con flechas en la figura y algún adenocarcinoma maligno, señalado con un asterisco (**Figura 17B**).



**Figura 17.** Combinación de la activación definida de KrasV12 en pulmón con la expresión de los factores de reprogramación *in vivo*. (A) Representación esquemática del diseño experimental de activación de KrasV12 en pulmón mediante administración intratraqueal de Ad-Cre en ratones i4F o i4F/KrasV12. Tras cuatro meses se administra doxiciclina (0,2 mg/mL) en agua de bebida durante dos semanas y media. Los ratones se sacrifican tras un periodo de tres días después del tratamiento. (B) Imagen representativa de la sección de un pulmón i4F/KrasV12 teñido con hematoxilina & eosina (H&E), con múltiples lesiones de tipo adenoma (flechas) y un adenocarcinoma (asterisco).

Realizamos una tinción  $\beta$ -galactosidasa asociada a senescencia (SA- $\beta$ -Gal, *Senescence Associated  $\beta$ -Galactosidase*) de los pulmones doble transgénicos y observamos que las lesiones de tipo adenoma son senescentes, como había sido descrito previamente, mientras que los adenocarcinomas malignos no lo son (Collado et al., 2005) (**Figura 18A**).

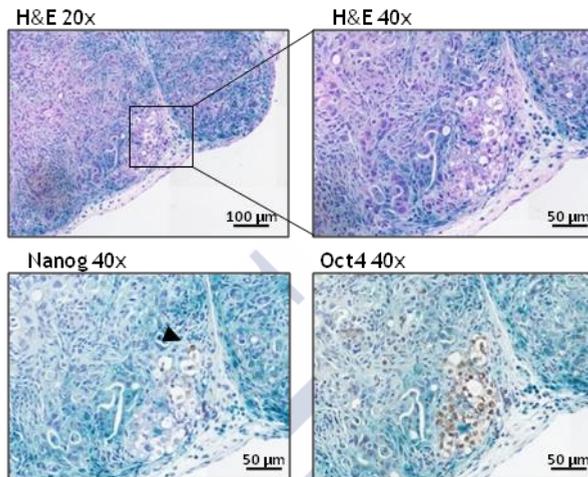


**Figura 18. Senescencia en los pulmones i4F/KrasV12.** (A) Imagen representativa de la sección teñida para H&E de un pulmón i4F/KrasV12 con múltiples lesiones de tipo adenoma y un adenocarcinoma, tras tinción *whole mount* SA- $\beta$ -Gal. (B) Detalle de un adenoma teñido con H&E (20x y 40x) e inmunohistoquímica frente a Oct4 (40x).

Para comprobar la correcta inducción de los factores tras el tratamiento con doxiciclina empleamos el páncreas como tejido control, ya que se trata de uno de los órganos con mayor incidencia de eventos de reprogramación *in vivo*. Realizamos una tinción SA- $\beta$ -Gal del páncreas. El análisis histológico reveló la presencia de células senescentes, resultado de la expresión del casete transgénico, y cómo las regiones con displasia, resultado del proceso de dediferenciación, presentan células Oct4 y Nanog positivas (**Figura 19**), lo que indica que se ha producido un evento de reprogramación *in vivo*. El marcaje con Oct4 es más potente y tras el período de tres días desde el final del

## RESULTADOS

tratamiento con doxiciclina esta expresión debe ser endógena, por lo que será el anticuerpo empleado para el análisis inmunohistoquímico de los pulmones.



**Figura 19.** Efecto de la expresión de los factores de reprogramación en páncreas. Imágenes representativas de secciones, tras tinción *whole mount* SA- $\beta$ -Gal, del páncreas de un ratón i4F tratado con doxiciclina. Se muestra la tinción H&E (20x y 40x) e inmunohistoquímicas frente a Nanog y Oct4 (40x).

Mientras que los pulmones de ratones i4F tratados con doxiciclina no presentan células Oct4 positivas (**Figura 20A**), como cabía esperar ya que se trata de un tejido “resistente” a la reprogramación; en los ratones doble transgénicos, i4F/Kras, encontramos grupos de células positivas para Oct4, indicativas de la reprogramación, asociadas a zonas con adenomas (**Figura 20B**). El análisis inmunohistoquímico de los pulmones teñidos para SA- $\beta$ -Gal reveló que estos grupos de células Oct4 positivas aparecen asociadas a adenomas senescentes (**Figura 18B**).

El análisis histológico de los pulmones i4F/KrasV12 tratados con doxiciclina muestra la aparición de pequeños grupos de células Oct4 positivas asociados a lesiones precancerosas. Estas células pueden ser indicativas de eventos de desdiferenciación producidos en el contexto de daño oncogénico.

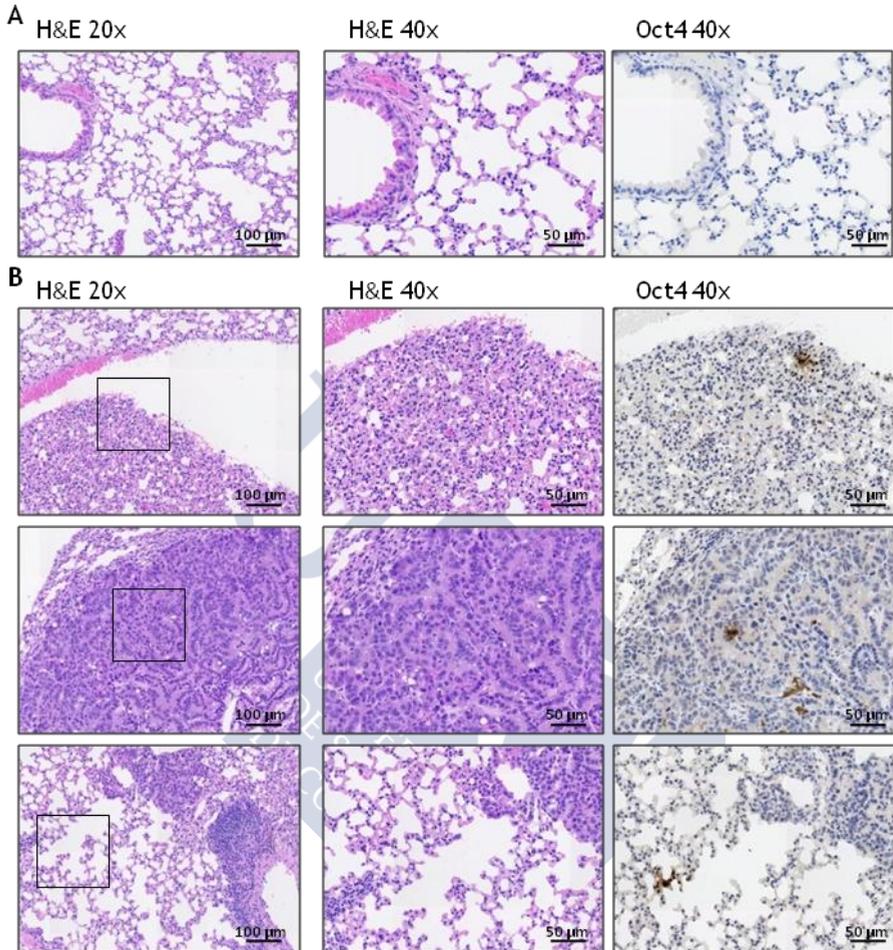


Figura 20. Análisis histológico de los pulmones i4F/KrasV12. Imágenes representativas de secciones de pulmones control (i4F) (A); o doble transgénicos (i4F/KrasV12) (B); tras el tratamiento con Ad-Cre y doxiciplina. Se muestra la tinción con H&E (20x y 40x) y la inmunohistoquímica frente a Oct4 (40X).

### 1.2.2. Modelos animales de carcinogénesis química

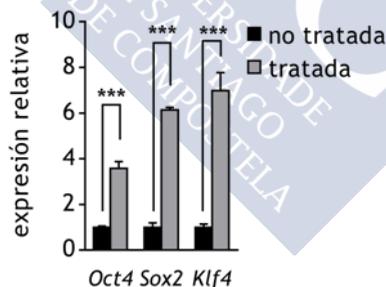
Tras comprobar que la activación definida de KrasV12 produce la aparición de células Oct4 positivas asociadas a adenomas, decidimos probar distintos protocolos de carcinogénesis química.

## RESULTADOS

### 1.2.2.1. Tratamiento con DMBA en piel

El tratamiento con DMBA (7, 12-dimetilbenzantraceno) es el primer paso de iniciación de un protocolo clásico de carcinogénesis química en piel. Su aplicación provoca la mutación en *Hras* y requiere del tratamiento posterior con un agente promotor de la proliferación como el TPA (12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato) para producir la formación de un tumor (Abel et al., 2009).

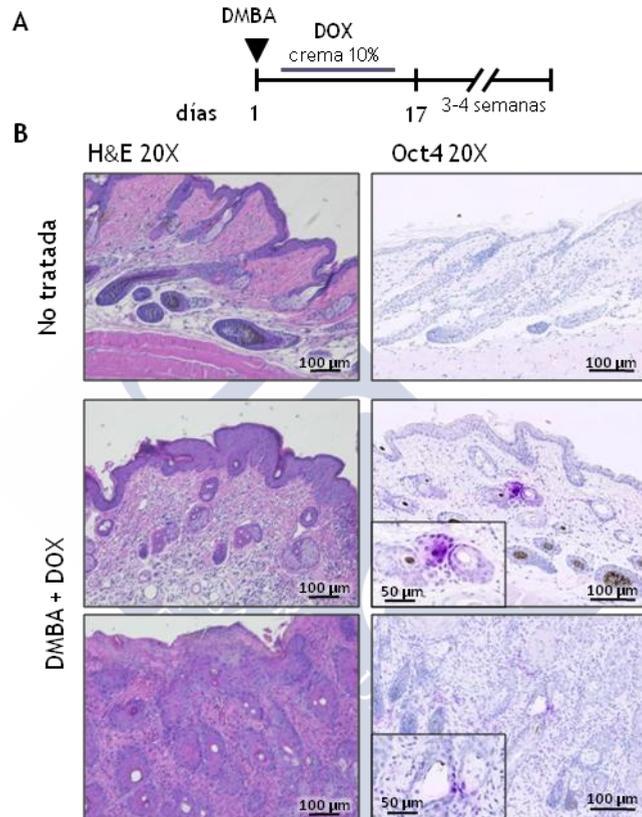
Desarrollamos una pomada de doxiciclina para inducir la expresión del casete transgénico exclusivamente en piel, con el fin de disponer de más tiempo para analizar el efecto producido en este tejido sin la aparición de teratomas en órganos vitales. Para comprobar su efectividad primero tratamos una zona de la piel de un ratón i4F durante 7 días, administrando crema de doxiciclina al 2% cada dos días. Tras los 7 días, sacrificamos al ratón y analizamos por qRT-PCR la expresión del casete transgénico en piel mediante los niveles de mRNA de los factores de reprogramación: *Oct4*, *Sox2* y *Klf4* (**Figura 21**). La crema nos permite inducir de forma eficiente la expresión del casete transgénico en piel, siendo los valores obtenidos en la zona tratada, entre 3 y 7 veces más altos que en la piel sin tratar.



**Figura 21. Efectividad de la doxiciclina en crema.** Análisis por qRT-PCR de la expresión de mRNA de los factores de reprogramación: *Oct4*, *Sox2* y *Klf4*, en la piel tratada frente a la piel no tratada, tras 7 días de tratamiento con crema de doxiciclina al 2% (w/v). La significación estadística se analizó mediante el test *t* de *student* de dos colas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; n.s. no significativo.

Una vez que comprobamos la efectividad de la crema, llevamos a cabo el tratamiento con DMBA en ratones i4F para inducir la aparición de mutaciones en *Hras* y a continuación, en lugar de TPA,

aplicamos doxiciclina en crema (10%) durante dos semanas y media. Tras finalizar el tratamiento, esperamos entre 3 y 4 semanas para analizar histológicamente la piel (**Figura 22A**).



**Figura 22.** Combinación del tratamiento de DMBA con la expresión de los factores de reprogramación en piel *in vivo*. (A) Representación esquemática del diseño experimental de tratamiento con DMBA seguido de la administración de doxiciclina en crema (10% w/v) durante dos semanas y media. Los ratones se sacrificaron para el análisis histológico de la piel tras 3-4 semanas desde el fin del tratamiento. (B) Imágenes representativas de secciones de piel no tratada (arriba) o tratada con DMBA y doxiciclina (abajo) teñidas para H&E (20x) o inmunohistoquímica frente a Oct4 (20x), con detalle a 40x.

Encontramos que la piel tratada con DMBA y doxiciclina presenta una histología alterada comparada con una piel sana, sin ningún tratamiento. El análisis histológico muestra un engrosamiento

## RESULTADOS

evidente y una estructura desorganizada. Asociadas a esta zona de engrosamiento encontramos grupos de células positivas para *Oct4* que podrían ser indicativos de eventos de reprogramación asociados al tratamiento con DMBA y doxiciplina (**Figura 22B**).

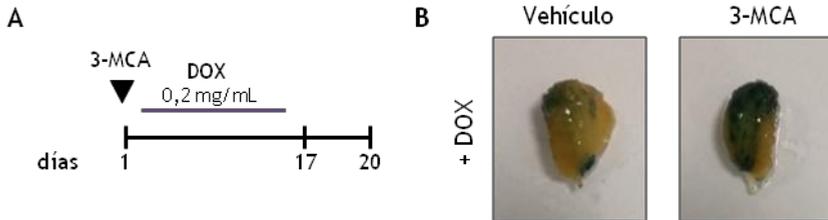
### 1.2.2.2. Inyección intramuscular de 3-MCA

La inyección intramuscular de 3-MCA (3-metilcolantreno) induce la formación de tumores de tipo fibrosarcoma debidos a la acumulación de mutaciones aleatorias y al crecimiento de células con mutaciones en genes clave como Ras o p53 (Halevy et al., 1991; Watanabe et al., 1999).

Nos planteamos combinar la inyección intramuscular de 3-MCA con la expresión de los factores OSKM *in vivo* para comprobar si el daño oncogénico inducido por el 3-MCA logra, en combinación con los factores, que se produzca la reprogramación de músculo, un tejido resistente a la reprogramación en condiciones normales. Estudios previos muestran que tras inducir distintos tipos de daño en el músculo la expresión de los factores puede llegar a inducir la formación de teratomas (Chiche et al., 2017).

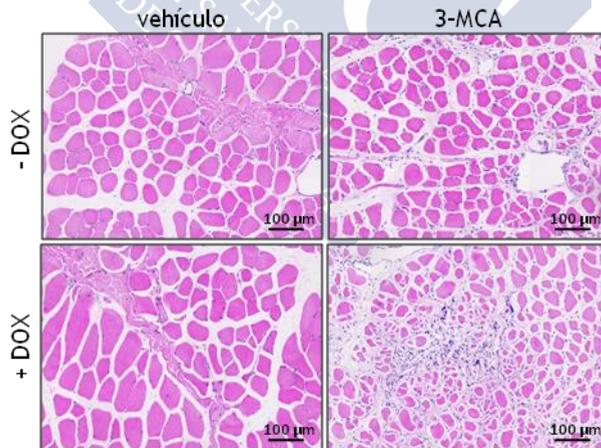
Inyectamos 3-MCA (1 mg) en el *tibialis anterior* (TA) de ratones i4F a los que, a continuación, administramos doxiciplina (0,2 mg/mL) en el agua de bebida durante dos semanas y media. Tras un período de 3 días desde el fin del tratamiento, los ratones fueron sacrificados y analizamos histológicamente el músculo (**Figura 23A**).

Quisimos ver si la inyección con 3-MCA provocaba una respuesta de senescencia celular, para ello realizamos una tinción SA- $\beta$ -Gal, tras el tratamiento con doxiciplina, del músculo inyectado con 3-MCA y del músculo control, inyectado con el vehículo. Observamos que el músculo con 3-MCA presenta una mayor tinción asociada a senescencia que el músculo control (**Figura 23B**).



**Figura 23.** Combinación de la inyección intramuscular de 3-MCA con la expresión de los factores de reprogramación *in vivo*. (A) Representación esquemática del diseño experimental de inyección intramuscular de 3-MCA en el TA seguida de la administración de doxiciclina (0,2 mg/mL) en el agua de bebida durante dos semanas y media. Los ratones se sacrificaron para el análisis histológico de los TA tras 3 días desde el fin del tratamiento. (B) Imágenes representativas de la tinción *whole mount* SA-β-Gal del músculo TA inyectado con 3-MCA o con el vehículo como control tras el tratamiento con doxiciclina.

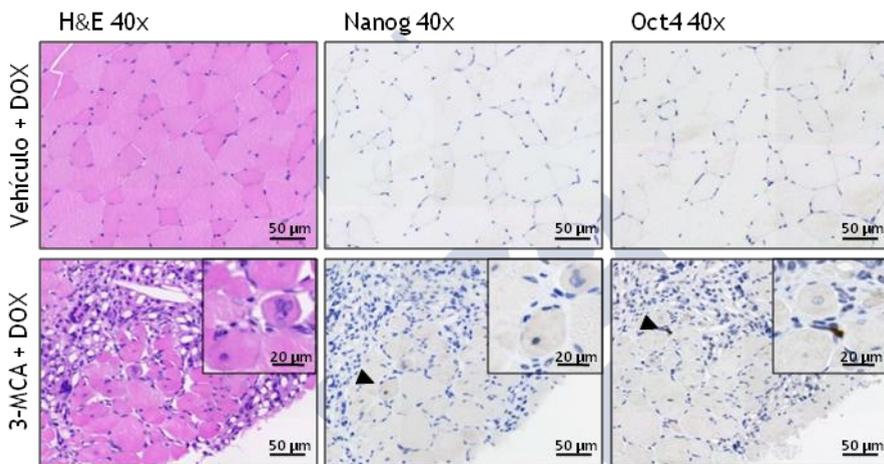
Tras el análisis histológico del tejido encontramos que la inyección control no altera la estructura de las fibras musculares, independientemente del tratamiento con doxiciclina. Sin embargo, la inyección de 3-MCA produce daño en el músculo y se refleja en la aparición de fibras de pequeño tamaño y con los núcleos centrales. La combinación del 3-MCA con el tratamiento con doxiciclina parece agudizar más este efecto (**Figura 24**).



**Figura 24.** Análisis histológico del TA tras la inyección de 3-MCA. Imágenes representativas de secciones de TA teñidas para H&E a 20x en las distintas condiciones: vehículo sin doxiciclina (arriba, izquierda), 3-MCA sin doxiciclina (arriba, derecha), vehículo con doxiciclina (abajo, izquierda), 3-MCA con doxiciclina (abajo, derecha).

## RESULTADOS

Cuando realizamos la inmunohistoquímica frente a los marcadores de pluripotencia Oct4 y Nanog comprobamos que el tratamiento con doxiciclina no es suficiente para inducir la aparición de células positivas para estos marcadores en el músculo inyectado con el vehículo, como cabía esperar por tratarse de un tejido resistente a la reprogramación. Sin embargo, en el músculo inyectado con 3-MCA encontramos células positivas tras el tratamiento con doxiciclina en zonas afectadas por el 3-MCA, con fibras musculares de pequeño tamaño y con núcleos centrales (**Figura 25**).

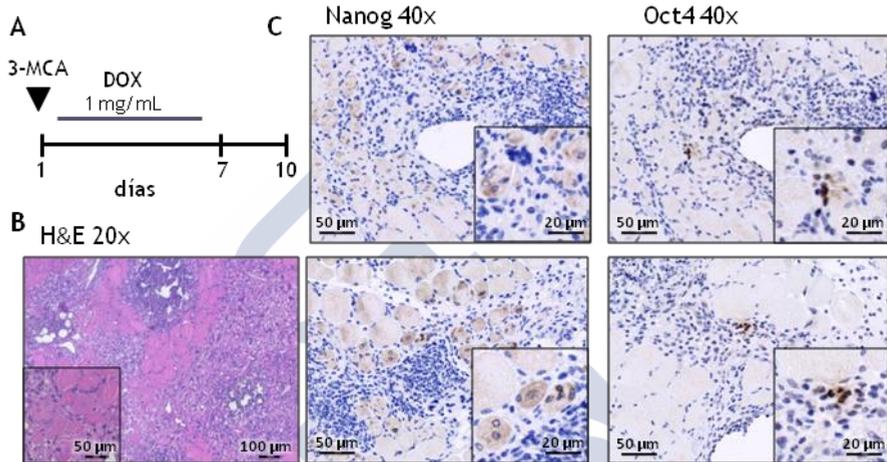


**Figura 25.** Análisis inmunohistoquímico del TA tras la inyección de 3-MCA. Imágenes representativas de secciones de TA teñidas para H&E y de la inmunohistoquímica frente a Nanog y Oct4 de un TA control (arriba) o inyectado con 3-MCA (abajo). Imágenes a 40x con detalle ampliado en la condición 3-MCA.

Realizamos otro protocolo en el que, tras la inyección de 3-MCA (1 mg) en el TA, aumentamos la dosis de doxiciclina administrada en el agua de bebida a 1 mg/mL, reduciendo el tiempo de tratamiento a una semana, tras lo cual esperamos tres días para la recogida del músculo (**Figura 26A**).

El análisis histológico concuerda con los resultados obtenidos en el experimento anterior. En el músculo control, tras el tratamiento con doxiciclina, la histología del músculo es normal, sin alteración de las fibras musculares. En el análisis inmunohistoquímico no encontramos

células Oct4 o Nanog positivas. Sin embargo, en el músculo inyectado con 3-MCA y tratado con doxiciclina encontramos zonas con una histología claramente afectada, con fibras musculares de pequeño tamaño y núcleos centrales asociados a zonas de inflamación e infiltración de células del sistema inmune (**Figura 26B**) y que presentan células positivas para Oct4 y Nanog (**Figura 26C**).



**Figura 26.** Combinación de la inyección intramuscular de 3-MCA con la expresión de los factores de reprogramación *in vivo*. (A) Representación esquemática del diseño experimental de inyección intramuscular de 3-MCA en TA seguida de la administración de doxiciclina (1 mg/mL) en el agua de bebida durante 7 días. Los ratones se sacrificaron para el análisis histológico de los TA tras 3 días desde el fin del tratamiento. (B) Imágenes representativas de secciones de TA inyectado con 3-MCA y tratado con doxiciclina, teñido para H&E (20x) y (C) de la inmunohistoquímica frente a Nanog y Oct4 (40x), con detalles ampliados.

Estos resultados, aunque preliminares, parecen indicar que la inducción de un estímulo oncogénico, ya sea mediante un sistema de activación oncogénica definida o mediante carcinogénesis química, permite que se produzcan eventos de reprogramación tras la expresión de los factores OSKM en tejidos normalmente resistentes.

### **2. REPROGRAMACIÓN CELULAR DE CÉLULAS TRANSFORMADAS**

Teniendo en cuenta que la inmortalización, paso imprescindible para alcanzar la transformación, favorece el proceso de reprogramación (Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009; Li et al., 2009; Marión et al., 2009; Utikal et al., 2009a) y nuestros resultados previos, que muestran como la introducción de un oncogén activo en el proceso de reprogramación favorece la generación de iPSC, quisimos analizar qué ocurre en un contexto de transformación completa ya que, a pesar de los múltiples intentos, la reprogramación con éxito de células transformadas continúa suponiendo un reto en el campo de investigación (Papapetrou, 2016; Yilmazer et al., 2015).

#### **2.1. Reprogramación de células transformadas *in vitro*.**

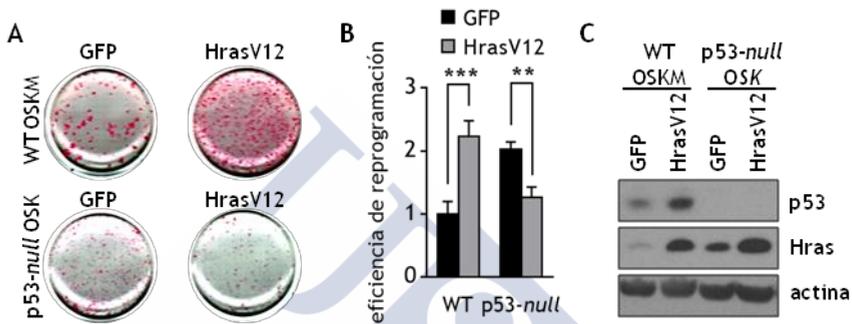
Para comenzar con el estudio de la reprogramación de células tumorales decidimos emplear un sistema de transformación definido, basado en la transformación de células *in vitro* mediante cooperación oncogénica.

##### ***2.1.1. La expresión de Ras oncogénico en células inmortales impone una barrera a la reprogramación celular***

En el primer apartado de resultados mostramos cómo la introducción de Ras oncogénico como cofactor en el cóctel de reprogramación aumenta la eficiencia del proceso, tanto en MEFs wt como en i4F-MEFs. La inmortalización, primer paso necesario para la transformación, supone también una ventaja para la reprogramación celular (Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009; Li et al., 2009; Marión et al., 2009; Utikal et al., 2009a). Teniendo en cuenta esto, nos planteamos estudiar el efecto de la expresión de Ras oncogénico sobre células inmortales por falta de supresores tumorales.

Llevamos a cabo la reprogramación celular de MEFs deficientes para el supresor tumoral p53 (p53-*null*), con los factores OSK retrovirales combinados con GFP o HrasV12. En el contexto de falta de p53 decidimos prescindir de *c-Myc*, ya que se sabe que no es fundamental para la reprogramación y por su importante función oncogénica (Nakagawa et al., 2008). En paralelo, como control, realizamos la reprogramación de MEFs wt con los factores OSKM

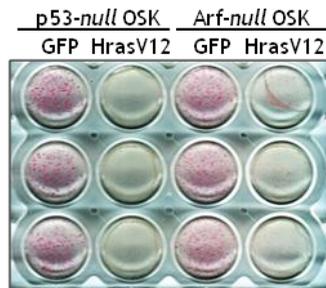
retrovirales combinados con GFP o HrasV12. Observamos que mientras que en MEFs wt, la introducción de HrasV12 provoca el aumento de eficiencia de reprogramación, como hemos descrito anteriormente, en el contexto de falta de p53 la introducción de HrasV12 supone una menor eficiencia (**Figura 27A-B**). Analizamos mediante *Western blot* los niveles de sobreexpresión de Ras en ambos tipos celulares, siendo similares en las dos condiciones (**Figura 27C**).



**Figura 27. Comparación del efecto de HrasV12 sobre la reprogramación de MEFs wt y p53-null.** (A) Tinción AP de MEFs wt con los factores retrovirales OSKM combinados con GFP o HrasV12 (arriba) y de MEFs p53-null con los factores retrovirales OSK combinados con GFP o HrasV12 (abajo). (B) Cuantificación de la eficiencia de reprogramación relativa a la obtenida en los MEFs wt con OSKM y GFP. (C) Análisis por *Western blot* de los niveles proteicos de p53 y Hras, y actina como control de carga en las cuatro condiciones.

Quisimos comprobar si se trataba de un efecto específico de células carentes de p53 o bien, si se producía también en células carentes de otros supresores tumorales. Para ello empleamos MEFs *Arf-null* y en paralelo, de nuevo MEFs *p53-null*. La falta de ambos genes supone una ventaja para la reprogramación celular. Introdujimos los factores *Oct4*, *Sox2* y *Klf4* (OSK) mediante vectores retrovirales combinados con HrasV12 o con GFP como control en los dos tipos celulares. Observamos que mientras que en la condición control con OSK y GFP logramos una reprogramación muy eficiente tanto en los MEFs *p53-null* como en los *Arf-null*, la expresión de HrasV12 dificulta la obtención de colonias de iPSC, llegando incluso a bloquearla por completo en el caso de los MEFs *p53-null* (**Figura 28**).

## RESULTADOS



**Figura 28. Efecto de Ras sobre la reprogramación de células inmortales.** Tinción AP de MEFs p53-null o Arf-null con los factores retrovirales OSK combinados con GFP o HrasV12.

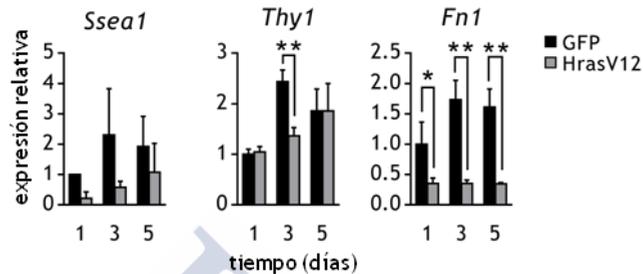
Estos resultados indican que la combinación de eventos oncogénicos que provocan la transformación completa, bloquea la reprogramación celular, a pesar de que, por separado, ambos sean capaces de favorecerla.

### ***2.1.2. Cambios en la expresión génica inducidos por Ras oncogénico en MEFs p53-null de manera independiente de OSKM***

En el contexto de MEFs wt, encontramos que la sobreexpresión de HrasV12 induce, de forma independiente a los factores de reprogramación, cambios en la expresión de algunos genes relacionados con la pluripotencia y la identidad celular (**Figura 12**). Quisimos ver qué ocurría con los genes previamente analizados en el contexto de falta de p53.

Para ello sobreexpresamos NrasV12, o GFP como control, en MEFs p53-null que mantuvimos en condiciones de reprogramación y en los que analizamos mediante qRT-PCR los niveles de expresión del gen de pluripotencia *Ssea1* y los genes de identidad celular *Thy1* y *Fn1*, a distintos tiempos. A diferencia de lo que ocurría con los MEFs wt, no encontramos diferencias significativas en los niveles de expresión de *Ssea1*, y la tendencia observada es de valores inferiores en la condición con NrasV12 comparada con el control. Para los genes de identidad celular, *Thy1* y *Fn1*, sí que encontramos diferencias significativas, siendo los niveles de expresión en los MEFs p53-null con NrasV12 inferiores a los del control. Los niveles de *Thy1*

presentan diferencias significativas solo en el tercer día tras la sobreexpresión de NrasV12, mientras que para *Fn1* las diferencias se mantienen en todos los puntos analizados (**Figura 29**).



**Figura 29.** Cambios de expresión inducidos por la sobreexpresión de Ras oncogénico en MEFs p53-null. Análisis por qRT-PCR de la expresión de mRNA del gen de pluripotencia *Ssea1* y de los genes de identidad celular propios de fibroblastos: *Thy1* y *Fn1*, en MEFs p53-null que sobreexpresan HrasV12 o GFP como control, y que fueron mantenidos en medio de reprogramación. Los niveles se determinaron tras 1, 3 y 5 días desde la sobreexpresión y se relativizaron frente al nivel de los MEFs p53-null con GFP a día 1. La significación estadística se analizó mediante el test *t* de student de dos colas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; n.s. no significativo.

Estos resultados indican que la expresión de Ras oncogénico en células p53-null induce cambios en la expresión de genes relacionados con la identidad celular pero, sin embargo, no afecta al gen de pluripotencia analizado, *Ssea1*.

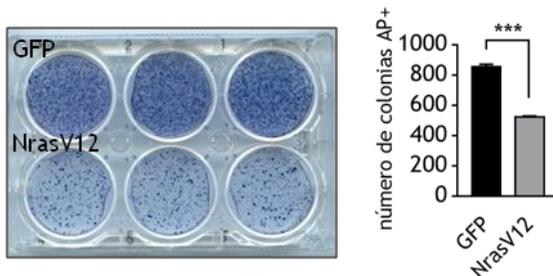
### 2.1.3. Efecto paracrino de células p53-null expresando Ras

En el primer apartado de resultados vimos que el efecto de Ras oncogénico sobre la eficiencia de reprogramación en MEFs wt se produce de manera extrínseca y está mediado en parte por factores solubles secretados por las células que expresan Ras. Esto nos llevó a tratar de analizar el efecto del medio condicionado de células p53-null que expresan NrasV12 sobre la reprogramación de MEFs wt con OSKM.

En este caso el tratamiento con medios condicionados por MEFs p53-null con Ras durante reprogramación no provoca el aumento de la eficiencia de reprogramación, e incluso produce una disminución del

## RESULTADOS

número de colonias obtenidas respecto a la condición control, tratada con medio condicionado por MEFs p53-*null* con GFP (**Figura 30**).



**Figura 30.** Estudio del efecto del medio condicionado por MEFs p53-*null* que sobreexpresan NrasV12 sobre reprogramación. Tinción AP de MEFs wt transducidos con los factores OSKM retrovirales y tratados durante la reprogramación con medios condicionados por MEFs p53-*null* que expresan GFP (arriba) o NrasV12 (abajo). Cuantificación del número de colonias positivas para AP. La significación estadística se analizó mediante el test *t* de student de dos colas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; n.s. no significativo.

Nos planteamos estudiar el efecto que producen estas células carentes de p53 expresando NrasV12 sobre la expresión de genes de pluripotencia e identidad celular en MEFs wt. Para ello decidimos emplear el sistema de cocultivo en *transwell*. Sembramos los MEFs p53-*null* con NrasV12 o GFP en el dispositivo y los MEFs wt, que serán las células diana, en el fondo del pocillo en que colocamos el *transwell*. Analizamos mediante qRT-PCR los niveles de expresión de mRNA del gen de pluripotencia *Ssea1* y de los genes de identidad celular *Thy1* y *Fnl1*, en las células diana tras uno, tres o cinco días de cocultivo. En el caso de *Ssea1* encontramos niveles de expresión más bajos en las células cocultivadas con los MEFs p53-*null* que expresan NrasV12 tras un día de cocultivo. Para *Thy1* no encontramos diferencias significativas en ninguno de los puntos analizados mientras que para el otro marcador de identidad mesenquimal empleado, *Fnl1*, los niveles en células cocultivadas con MEFs p53-*null* expresando NrasV12 son inferiores que en la situación control en los días 1 y 3 (**Figura 31**).

Estos resultados muestran que el medio condicionado por MEFs p53-*null* que sobreexpresan Ras oncogénico no logra favorecer la reprogramación de otras células.

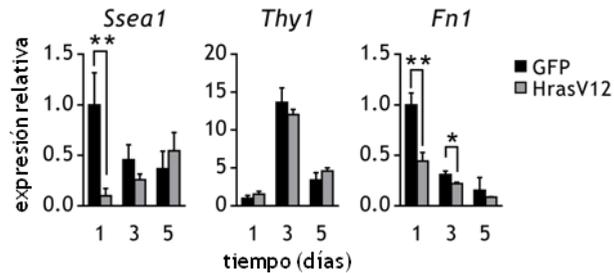


Figura 31. Efecto paracrino de MEFs p53-null que sobreexpresan HrasV12 sobre la expresión de genes de pluripotencia e identidad celular en MEFs wt. Análisis por qRT-PCR de la expresión de mRNA del gen de pluripotencia *Ssea1* y de los genes de identidad celular propios de fibroblastos: *Thy1* y *Fn1*, en MEFs wt cocultivados en un sistema de *transwell* con MEFs p53-null que sobreexpresan NrasV12 o GFP durante 1, 3 y 5 días. Los niveles son relativos a la expresión en los MEFs de la condición control a día 1. La significación estadística se analizó mediante el test *t* de student de dos colas: \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; n.s. no significativo.

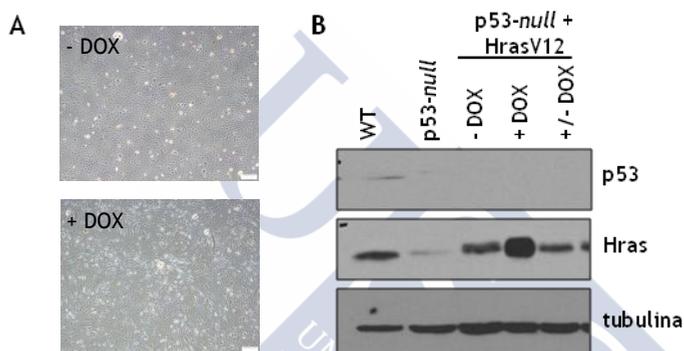
#### 2.1.4. Desarrollo de un sistema celular reversible de transformación

Tras observar el cambio tan drástico sobre la eficiencia de reprogramación que supone el establecimiento de la transformación completa cuando la comparamos con la inmortalización o la sobreexpresión de un único oncogén activo, quisimos profundizar más en el estudio de los cambios que se producen tras la cooperación oncogénica.

Para ello generamos un sistema celular que nos permite realizar el cambio de inmortalización a transformación y revertirlo mediante el empleo de un sistema inducible. Empleamos como células parentales MEFs p53-null en fase temprano, inmortales debido a la falta de p53, pero que no han adquirido más alteraciones pro-oncogénicas derivadas del mantenimiento en cultivo. Para lograr la transformación completa, expresamos en estos MEFs el oncogén HrasV12 mediante el vector lentiviral inducible por tetraciclina (pInducer20-HrasV12). De este modo, en ausencia de doxiciclina las células se mantienen en estado inmortalizado por falta de p53 y sólo cuando añadimos doxiciclina al cultivo alcanzan la transformación completa por la expresión de HrasV12, lo que se refleja en un cambio morfológico (**Figura 32A**) y en una mayor proliferación. La retirada de doxiciclina permite la

## RESULTADOS

reversión de este estado de una forma rápida. Analizamos por *Western blot* los niveles proteicos de Ras en las tres condiciones: células inmortales, que no han expresado nunca HrasV12 (-DOX); células transformadas, mantenidas en cultivo en presencia de doxiciclina durante 5 pases (+DOX); y reversión de la transformación, células a las que tras 5 pases en presencia de doxiciclina les retiramos el inductor durante un pase (+/-DOX). Vemos cómo los niveles de Ras aumentan en respuesta al inductor y que, tras su retirada, vuelven rápidamente a los niveles iniciales (**Figura 32B**).

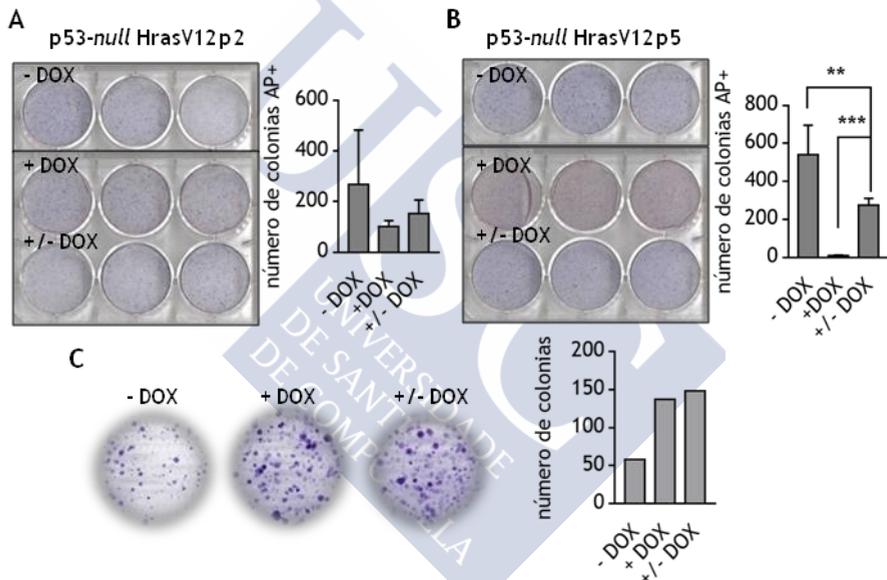


**Figura 32. Sistema de transformación celular inducible y reversible *in vitro*.** (A) Imagen de campo claro (10x) representativa de los MEFs p53-null transducidos con el vector inducible de HrasV12 en ausencia (-DOX) o presencia (+DOX) de doxiciclina. (B) Análisis por *Western blot* de los niveles proteicos de p53 y Hras, y tubulina como control de carga en las condiciones de immortalización (-DOX), transformación (+DOX) o reversión de la transformación (+/-DOX) del sistema generado. Como control se muestran los niveles en MEFs wt y p53-null. Todos los tipos celulares fueron analizados tras la expresión de los factores de reprogramación OSK.

Empleamos este sistema celular en un experimento de reprogramación *in vitro* en el que evaluamos las tres condiciones distintas. Para ensayar la condición de immortalización (-DOX) mantuvimos las células durante dos pases en cultivos tras la transducción con el vector inducible de HrasV12, pero sin añadir el inductor en ningún momento. En paralelo mantuvimos otro cultivo con doxiciclina de manera continua, que será nuestra condición transformada (+DOX). Estas últimas células transformadas las empleamos en dos situaciones: manteniendo la inducción de HrasV12 con doxiciclina durante todo el proceso de reprogramación; o bien

retirando la doxiciclina y, por tanto, revirtiendo la transformación (+/- DOX) en el momento en el que expresamos los factores OSK.

Cuando en estas células expresamos los factores OSK, de nuevo prescindiendo de *c-Myc*, mediante vectores retrovirales y analizamos la eficiencia de reprogramación, no encontramos diferencias significativas. Sin embargo, observamos una tendencia que indica que las células inmortalizadas (-DOX) se reprograman de forma muy eficiente, mientras que las transformadas (+DOX) tienen más dificultades y este efecto se revierte en parte en la situación de reversión de transformación (+/- DOX) (**Figura 33A**).



**Figura 33. Reprogramación *in vitro* de las células p53-null con HrasV12 inducible. (A)** Tinción AP de MEFs p53-null con el vector inducible de HrasV12 en pase 2 en: estado inmortalizado (-DOX), transformado (+DOX) o tras revertir la transformación (+/- DOX) y cuantificación del número de colonias positivas para la tinción AP. **(B)** Tinción AP de MEFs p53-null con el vector inducible de HrasV12 en pase 5 en las mismas condiciones que en (A) y cuantificación del número de colonias positivas para la tinción AP. **(C)** Tinción con cristal violeta de un ensayo de formación de colonias a baja densidad de las células ensayadas en (B) y cuantificación del número de colonias obtenidas en cada condición.

## RESULTADOS

Tras observar esta tendencia, repetimos el experimento, pero en esta ocasión reforzamos el fenotipo transformado manteniendo las células en cultivo durante cinco pases previos al ensayo y por lo tanto expresando HrasV12 durante más tiempo en presencia de doxiciclina. Cuando llevamos a cabo la reprogramación de estas células observamos cómo se agudiza la tendencia observada en el experimento anterior. En la situación de inmortalización se produce una reprogramación muy eficiente, la transformación por expresión de HrasV12 supone una caída drástica del número de colonias de iPSC, siendo esta bajada significativa respecto a la condición inmortalizada. La retirada de doxiciclina en el momento de expresión de los factores, permite una recuperación parcial, pero significativa de la eficiencia de reprogramación (**Figura 33B**).

Estas células, en las tres condiciones evaluadas, fueron ensayadas también en un experimento de formación de colonias de transformación a baja densidad para evaluar su estado de transformación. Las células inmortalizadas (-DOX) son capaces de formar colonias, pero cuando analizamos las células transformadas (+DOX), tras cinco pases en presencia del inductor, observamos un aumento en el número de colonias obtenidas. La retirada de doxiciclina tras cinco pases no es suficiente, al tiempo analizado, de revertir el efecto sobre el ensayo de formación de colonias (**Figura 33C**).

A continuación, quisimos analizar qué ocurría cuando tratábamos de reprogramar estas células en un contexto *in vivo*. Para ello inyectamos estas células con los factores OSK en el riñón de ratones C57BL/6.

Partimos de células transformadas tras la inducción de HrasV12 con doxiciclina durante cinco pases en cultivos. Realizamos una transducción retroviral con los factores OSK, en presencia de doxiciclina (+DOX) o retirándola para revertir la transformación (+/-DOX). Tras la transducción, inyectamos estas células en el riñón de los ratones. Las células transformadas fueron inyectadas en ratones a los que se les administró doxiciclina en el agua de bebida durante todo el proceso. Las células en las que queremos ver el efecto de revertir la

transformación, las inyectamos en ratones a los que no administramos doxiciclina.

Realizamos un seguimiento visual de los ratones y los sacrificamos en el momento en que detectamos mediante palpación la aparición de un tumor.

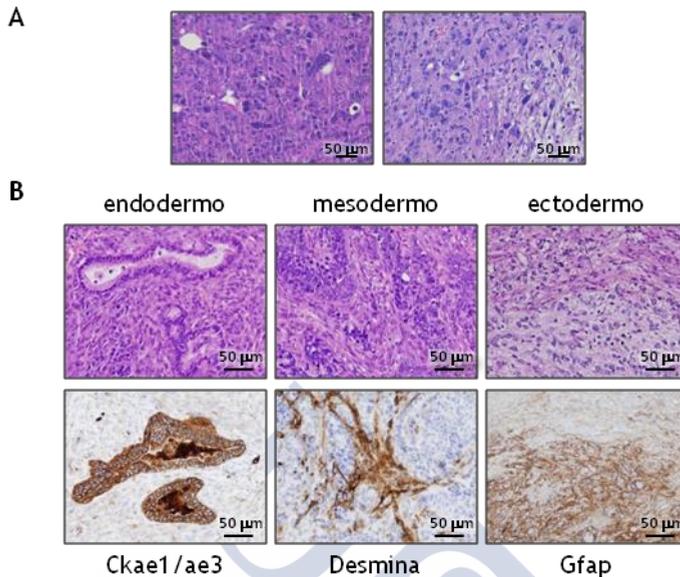
En el caso de las células con doxiciclina, y expresando por tanto HrasV12, todos los ratones (n=6) desarrollaron tumores tras 25-40 días desde la inyección. En el caso de las células a las que retiramos la doxiciclina, y por tanto con la expresión de HrasV12 apagada, solo dos de los ratones inyectados (n=7) desarrollaron un tumor a los 40 días desde la inyección, el resto de los ratones fueron sacrificados tras 60 días y no se encontró ningún crecimiento tumoral (**Tabla 1**). El análisis histológico de los tumores reveló que los tumores desarrollados en presencia de doxiciclina eran tumores de tipo fibrosarcoma con un alto grado de agresividad (**Figura 34A**). Sin embargo, los tumores desarrollados en ausencia de doxiciclina eran teratomas, ya que presentaban diferenciación a tejidos de las tres capas embrionarias, lo que se comprobó mediante el análisis inmunohistoquímico con marcadores específicos de las tres capas embrionarias: endodermo (Ck14/ae3), mesodermo (Desmina) y ectodermo (Gfap) (**Figura 34B**).

		Tumor	Teratoma	Total
p53-null HrasV12 + OSK	+ DOX	6	0	6/6
	+/- DOX	0	2	2/7

Tabla 1. Tabla resumen de los tumores obtenidos tras la inyección en riñón de las células p53-null con HrasV12 inducible.

Estos resultados indican que la transformación oncogénica genera un estado refractario a la reprogramación, tanto *in vitro* como *in vivo* y que este efecto puede revertirse tras la eliminación del estímulo transformante.

## RESULTADOS



**Figura 34. Reprogramación *in vivo* de las células *p53-null* con *HrasV12* inducible. (A) Imágenes representativas de secciones teñidas para H&E de tumores obtenidos tras la inyección en riñón de células *p53-null* con *HrasV12* inducible en presencia de doxiciclina. (B) Imágenes representativas de secciones de teratomas obtenidos tras la inyección en riñón de células *p53-null* con *HrasV12* inducible en ausencia de doxiciclina. Se muestra la tinción H&E de estructuras derivadas de las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo (arriba); y la inmunohistoquímica frente a marcadores específicos de cada capa: endodermo (Ck1/ae3), mesodermo (Desmina) y ectodermo (Gfap).**

### 2.2. Reprogramación de líneas tumorales de fibrosarcoma

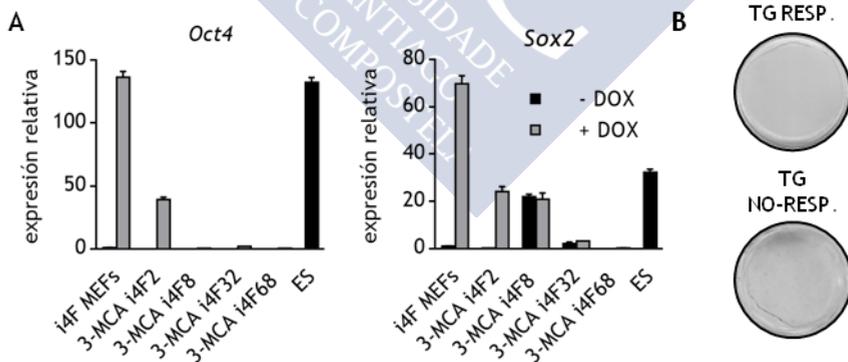
Hasta ahora habíamos trabajado con un sistema de transformación oncogénica definido, inducido por la falta de p53 y la expresión de Ras oncogénico, que nos permitió comprobar cómo la adquisición del estado transformado dificulta la obtención de iPSC. Para profundizar más en el estudio de la reprogramación de células transformadas, quisimos analizar qué ocurría con líneas celulares derivadas de tumores.

Empleamos un protocolo de carcinogénesis química consistente en la inyección intramuscular de 3-metilcolantreno (3-MCA), un potente carcinógeno, que provoca la formación de fibrosarcomas (Wexler and Rosenberg, 1979).

Tras la inyección intramuscular de 3-MCA en ratones wt e i4F, esperamos a que se desarrolle el tumor (3-5 meses desde la inyección). Realizamos el análisis histológico del tumor para comprobar que se trataba de fibrosarcomas y derivamos una línea celular a partir de cada uno de los tumores obtenidos (**Figura 37**).

**2.2.1. Reprogramación de líneas tumorales de fibrosarcoma *in vitro***

Una vez establecidas las líneas celulares transgénicas (i4F 3-MCA), quisimos comprobar cómo respondían a la doxiciclina. Añadimos doxiciclina al cultivo y tras 72 horas analizamos mediante qRT-PCR los niveles de mRNA de *Oct4* y *Sox2* procedentes de la expresión del casete transgénico. Como control empleamos i4F-MEFs en los que indujimos la expresión del casete en paralelo. De las cuatro líneas celulares analizadas (3-MCA i4F2, 3-MCA i4F8, 3-MCA i4F32, 3-MCA i4F68) solamente una de ellas, 3-MCA i4F2 respondía a la doxiciclina expresando los factores *Oct4* y *Sox2* y lo hacía a niveles inferiores a los obtenidos en los i4F-MEFs control. Las demás líneas analizadas presentan diferencias en cuanto a los niveles de expresión de partida de *Sox2* pero ninguna de ellas responde a la inducción con doxiciclina (**Figura 35A**).



**Figura 35. Reprogramación *in vitro* de las líneas de fibrosarcoma transgénicas. (A)** Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de expresión de los factores *Oct4* y *Sox2* tras 72 horas de inducción con doxiciclina en las líneas 3-MCA i4F y en i4F-MEFs como control. Como referencia se muestran los niveles de estos genes en células ES. Los valores se relativizaron frente a los niveles obtenidos en i4F-MEFs sin doxiciclina. **(B)** Tinción AP de la línea 3-MCA i4F2 respondedora (TG RESP.) y de la línea 3-MCA i4F32 no respondedora (TG NO-RESP.).

## RESULTADOS

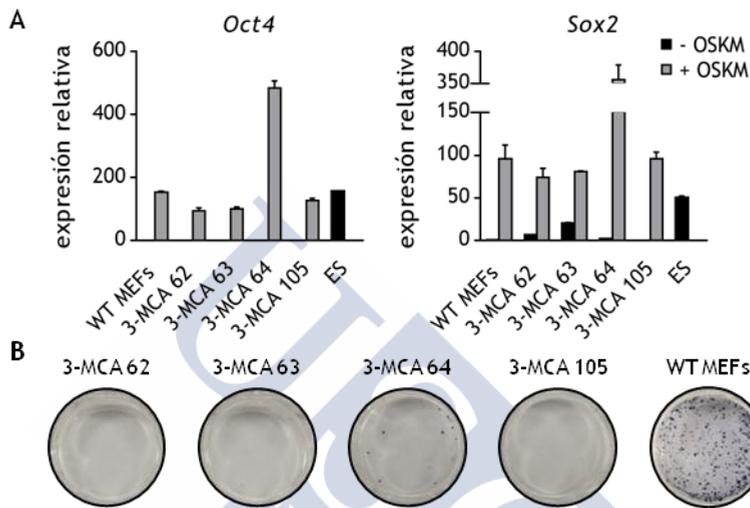
Cuando sometemos a estas células a un proceso de reprogramación *in vitro* observamos que la línea analizada que no responde a la doxiciclina (3-MCA i4F32, no-respondedora) no da lugar a ninguna colonia de iPSC, como cabía esperar; pero, incluso la línea celular que responde a la inducción con doxiciclina (3-MCA i4F2, respondedora), es incapaz de reprogramarse (**Figura 35B**).

Al comprobar que solo una de las líneas transgénicas generadas era capaz de responder a la doxiciclina y lo hacía a niveles inferiores a los MEFs control, quisimos aumentar el número de líneas con las que poder trabajar. Para ello, generamos líneas “reconstituidas” *in vitro*. Empleamos líneas de 3-MCA derivadas de ratones wt y las modificamos introduciendo el vector lentiviral Tet-O-FUW-OSKM y el rtTA de modo que expresen los factores en respuesta a la doxiciclina.

Tras la transducción lentiviral y la inducción con doxiciclina durante 72 horas, analizamos mediante qRT-PCR los niveles de mRNA de *Oct4* y *Sox2*, empleando como control MEFs wt transducidos e inducidos en paralelo. Encontramos que las cuatro líneas generadas son capaces de responder a la doxiciclina expresando los factores a niveles similares a los de los MEFs control, salvo una de las líneas (3-MCA 64) que lo hace a un nivel muy superior al de los MEFs control y muy por encima incluso del nivel de expresión de estos genes en células ES (**Figura 36A**).

Cuando sometimos a estas células a un proceso de reprogramación, tras siete días de expresión de los factores observamos que se produjo una respuesta de muerte celular en las líneas de fibrosarcoma quedando el cultivo gravemente afectado. Sin embargo, al tratarse de células tumorales, las células que quedaron consiguieron proliferar de nuevo. Los MEFs control no sufrieron este efecto, por lo que parece ser una respuesta específica de las líneas tumorales. Continuamos con la reprogramación hasta completar el proceso y tras realizar la tinción AP observamos que, mientras que en los MEFs control obtuvimos una reprogramación eficiente, las líneas de fibrosarcoma no consiguen generar ninguna colonia de iPSC, a excepción de la línea 3-MCA 64, que presentaba niveles de respuesta

a doxiciclina anormalmente elevados y que logra dar lugar a un bajo número de colonias positivas para la tinción fosfatasa alcalina (**Figura 36B**); aunque sería necesario realizar la caracterización en detalle de estas colonias para comprobar si se trata de verdaderas iPSCs.



**Figura 36. Reprogramación *in vitro* de las líneas de fibrosarcoma wt reconstituidas. (A)** Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de expresión de los factores *Oct4* y *Sox2* tras 72 horas de inducción con doxiciclina en las líneas 3-MCA wt reconstituidas (+OSKM) y en MEFs wt con OSKM lentiviral como control. Como referencia se muestran los niveles de estos genes en células ES. Los valores se relativizaron frente a los niveles obtenidos en MEFs wt. **(B)** Tinción AP de las líneas reconstituidas 3-MCA 62, 3-MCA 63, 3-MCA 64, 3-MCA 105 y de MEFs wt transducidos con OSKM lentiviral como control.

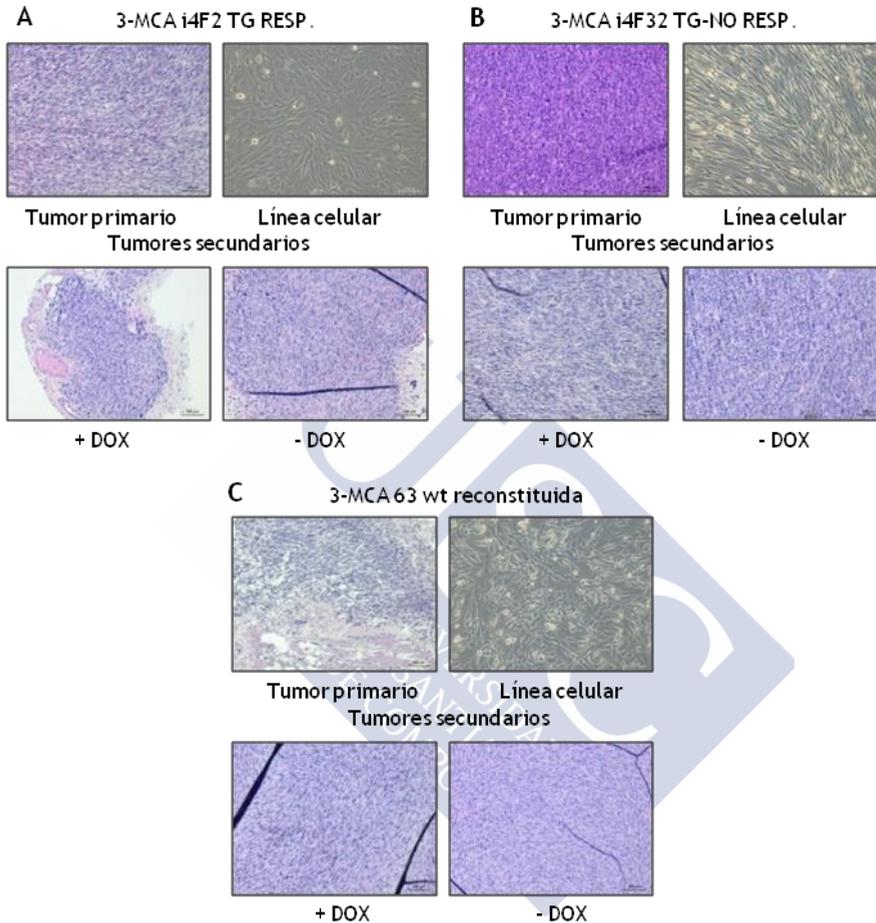
Estos resultados muestran como las líneas tumorales de fibrosarcoma i4F silencian la expresión del casete transgénico y cuando logramos expresar los factores de reprogramación mediante transducción lentiviral, estas líneas no son capaces de reprogramarse.

### 2.2.2. Reprogramación de líneas tumorales de fibrosarcoma *in vivo*

A continuación, quisimos estudiar el comportamiento de estas células *in vivo*. Para ello, las inyectamos de manera subcutánea en ratones inmunodeficientes *nude* con el fin de evaluar el efecto de la expresión de los factores de reprogramación *in vivo* por la

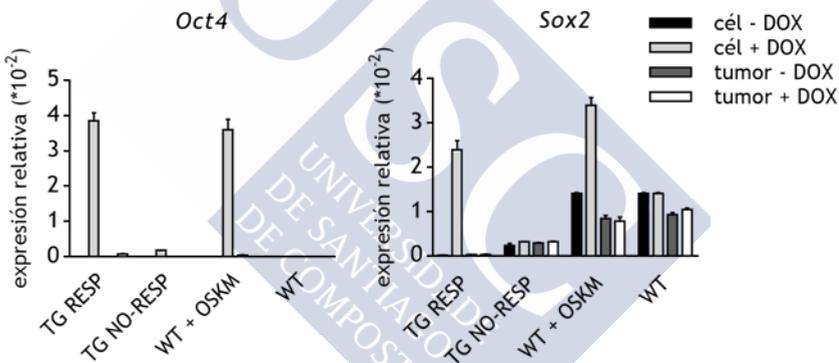
## RESULTADOS

administración de doxiciclina en el agua de bebida durante 2,5 semanas tras la inyección.



**Figura 37. Reprogramación *in vivo* de las líneas de fibrosarcoma.** Imágenes representativas de las secciones teñidas con H&E del tumor primario formado tras la inyección intramuscular de 3-MCA (arriba, izquierda). Imagen de campo claro de la línea celular derivada a partir de cada tumor (arriba, derecha). Imágenes representativas de las secciones teñidas con H&E de los tumores secundarios generados tras la inyección subcutánea en ratones *nude* tratados con doxiciclina (2 mg/mL) durante 2,5 semanas tras la inyección (+DOX; abajo, izquierda) o sin tratamiento (-DOX; abajo, derecha), para (A) la línea 3-MCA i4F 2 (TG RESPONDEDORA), (B) línea 3-MCA i4F 32 (TG NO-RESPONDEDORA) y (C) línea wt reconstituida.

Seleccionamos la línea transgénica respondedora (3-MCA i4F2), una de las no respondedoras (3-MCA i4F32) y una de las líneas wt reconstituidas (3-MCA 63). Tras la inyección, todas las líneas dieron lugar a tumores secundarios cuya histología recordaba a la histología del tumor primario del que derivamos la línea celular, tumores de tipo fibrosarcoma en los que no encontramos signos de diferenciación propios de teratomas (**Figura 37**). Analizamos mediante qRT-PCR los niveles de mRNA de los genes de pluripotencia *Oct4* y *Sox2* en las líneas celulares *in vitro* y en estos tumores. No encontramos diferencias entre los tumores crecidos en ratones tratados o no con doxiciclina (2 mg/mL) durante 2,5 semanas tras la inyección (**Figura 38**). Estos resultados indican que no se ha producido la reprogramación, ya que no se detectó la expresión de genes de pluripotencia endógenos y no dan lugar a ningún teratoma.



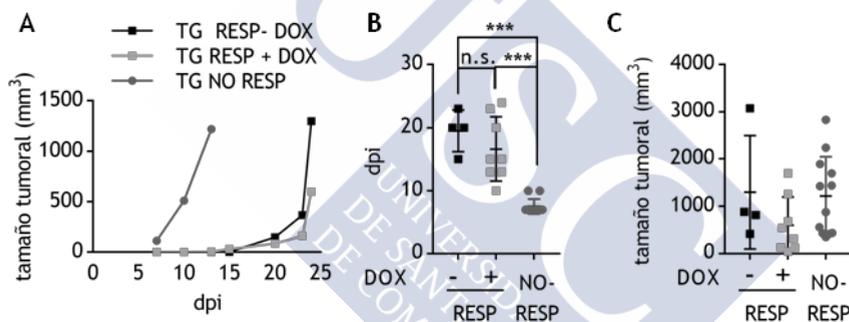
**Figura 38. Análisis de la expresión de *Oct4* y *Sox2* en los tumores secundarios obtenidos.** Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de expresión de mRNA de los factores *Oct4* y *Sox2* en las líneas celulares: TG respondedora (TG RESP.), TG no respondora (TG NO-RESP.) y wt reconstituida (WT+OSKM) o transducida con GFP (WT) como control; y en los tumores secundarios derivados de ellas. Se muestran los niveles de expresión tras 72 horas de inducción con doxiciclina *in vitro* (cél + DOX) o su control sin doxiciclina (cél -DOX) y los niveles obtenidos en los tumores inyectados en ratones con doxiciclina en el agua de bebida durante 2,5 semanas (tumor + DOX) o su respectivo control en ausencia de doxiciclina (tumor -DOX).

### 2.2.3. Efecto de la expresión de los factores OSKM sobre el desarrollo tumoral

Durante el experimento de reprogramación de las líneas de fibrosarcoma *in vivo* observamos que los tumores que expresaban los

## RESULTADOS

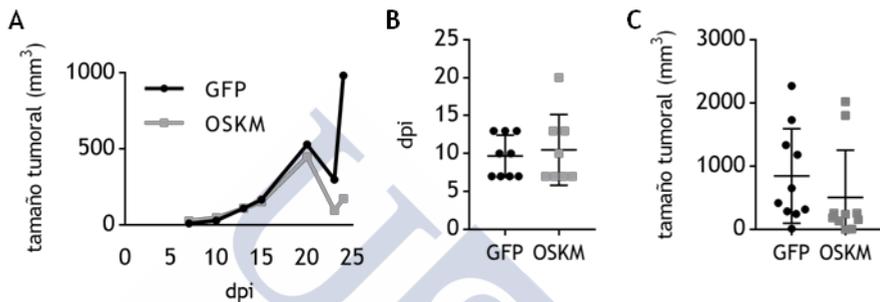
factores, ya sean los derivados de la línea transgénica respondedora o de la wt reconstituida, presentaban un tamaño sensiblemente inferior que sus respectivos controles sin doxyciclina, aunque esta observación no fue cuantificada. Quisimos analizar este efecto con más detalle y para ello realizamos un nuevo experimento de inyección subcutánea en ratones *nude*. En esta ocasión, aumentamos el número de líneas celulares empleadas, volvimos a analizar las líneas transgénicas respondedora y no respondedora y analizamos las cuatro líneas wt reconstituidas de las que disponemos. Tras la inyección administramos doxyciclina en el agua de bebida a lo largo de todo el experimento para permitir la expresión de los factores OSKM inducibles. El análisis histológico demostró, de nuevo, que todos los tumores obtenidos fueron de tipo fibrosarcoma.



**Figura 39. Crecimiento tumoral de las líneas de fibrosarcoma transgénicas. (A)** Gráfica mostrando el crecimiento tumoral tras la inyección subcutánea en ratones *nude* de las líneas celulares TG respondedora y TG no-respondedora. La línea respondedora se ensayó en presencia o ausencia de doxyciclina en el agua de bebida. **(B)** Gráfica mostrando el momento de inicio tumoral en días después de la inyección (dpi, *días post-inyección*) **(C)** Gráfica del tamaño final ( $\text{mm}^3$ ) alcanzado en el momento del sacrificio.

En el caso de las líneas transgénicas, el análisis del crecimiento tumoral muestra como las líneas no respondedoras inician el desarrollo tumoral antes y este es más rápido que en el caso de las respondedoras (**Figura 39A**). En la línea respondedora, los tumores aparecen más tarde, pero no encontramos diferencias entre la condición más o menos doxyciclina (**Figura 39B**). En cuanto al tamaño final alcanzado en el momento del sacrificio, no encontramos

diferencias significativas entre la línea respondedora y no respondedora. Tampoco encontramos diferencias entre la línea respondedora tratada o no con doxiciclina (**Figura 39C**). Cabe mencionar, que debido al crecimiento acelerado de la línea no respondedora, el sacrificio se llevó a cabo tras 13 días desde la inyección, mientras que los tumores producidos por la línea respondedora se extrajeron tras 25 días desde la inyección.



**Figura 40. Crecimiento tumoral de las líneas de fibrosarcoma wt reconstituidas** (A) Gráfica mostrando el crecimiento tumoral tras la inyección subcutánea en ratones *nude* de las líneas celulares wt reconstituidas o transducidas con GFP como control. El crecimiento tumoral se ensayó en presencia de doxiciclina en el agua de bebida. (B) Gráfica mostrando el momento de inicio tumoral en días después de la inyección (dpi). (C) Gráfica resumen del tamaño final ( $\text{mm}^3$ ) alcanzado por los tumores en el momento del sacrificio.

En el caso de las líneas wt reconstituidas, empleamos como control las mismas líneas transducidas con GFP y administramos doxiciclina en el agua de bebida a todos los ratones. Al analizar el crecimiento tumoral (**Figura 40A**) y el momento de aparición (**Figura 40B**) no encontramos diferencias significativas entre la línea con OSKM o el control con GFP. En cuanto al tamaño alcanzado en el momento de sacrificio, encontramos que las líneas que expresan los factores OSKM tienen una tendencia, aunque no significativa, hacia un tamaño menor que las de GFP, que presentan una mayor dispersión (**Figura 40C**). De las 10 inyecciones realizadas, en la condición OSKM, solo dos de los tumores alcanzan un tamaño superior a los  $300\text{mm}^3$ , mientras que en la condición con GFP, 7 de los 10 tumores sobrepasan este tamaño a tiempo final (**Tabla 2**).

## RESULTADOS

Tumores de tamaño > 300 mm <sup>3</sup>	
OSKM	2/10
GFP	7/10

Tabla 2. Tabla resumen de los tumores de más de 300 mm<sup>3</sup> obtenidos a partir de la línea de fibrosarcoma wt reconstituida (OSKM) o control (GFP). La significación estadística se analizó mediante el test exacto de Fisher de dos colas obteniendo una p=0,0698.

Nuestros resultados preliminares indican que la expresión de los factores de reprogramación en células tumorales no logra la reprogramación de estas y que por el contrario podría estar afectando al desarrollo tumoral.





## **DISCUSIÓN**



La reprogramación celular permite revertir el estado de diferenciación de una célula hasta alcanzar la pluripotencia (Takahashi and Yamanaka, 2006), lo que resulta de gran utilidad para el estudio de distintas patologías. Este proceso comparte ciertas similitudes con la transformación oncogénica. Sin embargo, la reprogramación de células transformadas supone un reto debido a la existencia de barreras específicas en estas células que se oponen a la obtención de iPSC (Ramos-Mejia et al., 2012).

La reprogramación de células tumorales, además de permitir desarrollar nuevos modelos del cáncer, puede aportarnos información valiosa sobre la identidad tumoral (Papapetrou, 2016). Descubrir las barreras que se oponen a la reprogramación de las células tumorales puede revelar vías fundamentales en el mantenimiento de esta identidad.

Teniendo en cuenta este planteamiento previo, nos planteamos estudiar la reprogramación de células tumorales. Comenzamos analizando el efecto de la activación oncogénica sobre el proceso de reprogramación en células primarias no transformadas para, a continuación, analizar el efecto producido sobre reprogramación cuando esta activación oncogénica conduce a la transformación completa.

Para estudiar el efecto de la activación oncogénica durante la reprogramación celular, seleccionamos el oncogén Ras en el contexto de células primarias. Escogimos este oncogén por tratarse del primero descrito y ser uno de los más frecuentemente mutados en cáncer (Cox and Der, 2010). Observamos que la expresión de los distintos miembros de la familia Ras, en su versión oncogénicamente activa, junto con los factores de reprogramación provoca un aumento en la eficiencia del proceso. Este resultado se ha confirmado mediante el empleo de distintos sistemas de reprogramación basados en la expresión de los factores de reprogramación a partir de vectores virales, así como en el uso de MEFs i4F, y con diferentes vectores de expresión de Ras, lo que refuerza nuestra conclusión.

Previamente se había descrito que Eras, una pequeña GTPasa *ras-like*, facilita la reprogramación a través de las vías de JNK-Sp1 (Kwon

## DISCUSIÓN

et al., 2015) o Akt-FoxO1 (Yu et al., 2014). Esta proteína está implicada en la proliferación y en las propiedades de tipo tumoral de las ESCs (Takahashi et al., 2003); y se expresa de forma exclusiva en células embrionarias. Por este motivo fue uno de los genes candidatos inicialmente considerados para la reprogramación (Takahashi and Yamanaka, 2006). En este trabajo, empleamos la versión oncogénica de los genes: *Hras*, *Kras* o *Nras*; que a diferencia de *Eras*, se expresan normalmente en células somáticas y su mutación resulta fundamental en tumorigénesis.

Esta familia oncogénica tiene numerosos efectores intracelulares, por ello, empleamos distintas estrategias experimentales para identificar cuál de las vías canónicas activadas por Ras era la responsable de este efecto. El empleo de plásmidos mutantes de Ras que activan específicamente las principales vías por debajo de Ras (Rodríguez-Viciano et al., 1997), nos permitió identificar la vía de MAPK/ERK como la principal mediadora de este efecto, lo que corroboramos con su modulación mediante el uso de inhibidores químicos o la sobreexpresión de efectores por debajo de Ras.

Esta vía juega un papel importante en el mantenimiento de la pluripotencia. Su inhibición mediante el tratamiento con inhibidores químicos de MEK (PD0325901), combinada con la inhibición de GSK-3 $\beta$  (CHIR99021) (medio 2i), en las células pluripotentes favorece que se mantengan en estado indiferenciado (Ying et al., 2008). Sin embargo, se ha visto que su papel cambia en las distintas etapas del proceso de reprogramación, y su activación es necesaria en el inicio (Prieto et al., 2016).

Tras observar que la activación de esta vía favorece el proceso de reprogramación quisimos comprobar si esta vía se activa de forma endógena durante la obtención de iPSC. El análisis de lncRNA (*long non-coding RNA*) durante el proceso de reprogramación había revelado previamente la activación de la vía de Ras, y de lncRNA asociados, como eventos moleculares característicos de las primeras etapas de reprogramación (Kim et al., 2015). Mediante el empleo de un sistema de *pull-down* que nos permite detectar los niveles de Ras activo comprobamos que la activación de esta vía se produce en los

primeros días del proceso y con su inhibición, se disminuye la eficiencia.

Nuestras observaciones de que la activación de esta vía se produce de manera endógena durante la reprogramación celular y de que su inhibición se opone a la obtención de células iPS, servirían para explicar, al menos en parte, que la sobreexpresión de Ras oncogénico provoque el aumento de eficiencia a través de la sobreestimulación de una vía imprescindible para el proceso.

A continuación, realizamos el estudio de las dinámicas de expresión de distintos genes durante el proceso de reprogramación con sobreexpresión de Ras.

Basándonos en que la expresión de Ras oncogénico en células primarias conduce a la entrada en OIS (Serrano et al., 1997) y la senescencia constituye una barrera para la reprogramación (Banito et al., 2009; Li et al., 2009; Utikal et al., 2009a), quisimos analizar distintos aspectos de la senescencia celular durante el proceso de reprogramación con sobreexpresión de Ras. El análisis de la expresión de genes relacionados con la senescencia muestra un aumento en los niveles de estos marcadores en la etapa inicial de reprogramación. Sin embargo, el cultivo presenta una menor actividad SA- $\beta$ -Gal que la condición control, lo que concuerda con una mayor proliferación inicial, que se iguala al tiempo final. Por tanto, a pesar de esta activación inicial de los genes relacionados con senescencia, las células logran reprogramarse de manera más eficiente.

Siguiendo con el análisis de las dinámicas de reprogramación, analizamos varios genes relacionados con la identidad celular. El proceso de reprogramación requiere del remodelado epigenético para que se produzca la expresión de los genes de pluripotencia, así como el silenciamiento de los genes de identidad celular propios de la célula parental (Apostolou and Hochedlinger, 2013; Polo et al., 2012). El análisis de las dinámicas de expresión en la reprogramación con Ras reveló un aumento acelerado en la expresión de los genes de pluripotencia y un menor nivel de expresión de genes propios de la identidad mesenquimal de los fibroblastos parentales. Para algunos de los genes analizados observamos que estos cambios se producían ya

## DISCUSIÓN

en el primer día de reprogramación. La rapidez de estos cambios nos hizo plantearnos si la expresión de Ras, por sí sola, podría ser la responsable de este efecto. Estudios previos muestran como la expresión de Ras en células primarias confiere a las células una mayor plasticidad que las predispone a la transformación neoplásica y a la adquisición de características de célula madre (Ischenko et al., 2013). Tras la expresión de Ras en MEFs wt, encontramos diferencias en la expresión de genes relacionados con la pluripotencia y la identidad celular. Estos cambios se producen en el mismo sentido que los cambios necesarios en reprogramación, disminuyendo los genes relacionados con la identidad celular de partida y aumentando genes relacionados con la pluripotencia. Además, la sobreexpresión de Ras produce cambios en los niveles de Sox2 endógeno. Estos niveles son suficientes para permitir la reprogramación en ausencia de Sox2 ectópico, aunque con una eficiencia extremadamente baja, por lo que esta inducción no sería suficiente para justificar el efecto de Ras sobre la eficiencia de reprogramación.

Para completar la caracterización del efecto producido por Ras, analizamos si el aumento de eficiencia de reprogramación se producía de manera intrínseca o extrínseca. Mediante la combinación de distintos plásmidos inducibles para los factores de reprogramación y para Ras, pudimos comprobar que en las propias células con sobreexpresión de Ras, la reprogramación es muy poco eficiente. Sin embargo, las células que expresan Ras favorecen la reprogramación de células del entorno. Este efecto extrínseco lo comprobamos utilizando co-cultivos de células que expresan Ras con MEFs i4F y mediante el tratamiento de MEFs i4F con medios condicionados por células que expresan Ras. Estos experimentos nos indican que el aumento de la eficiencia de reprogramación por Ras está mediado, al menos en parte, por factores solubles. Este efecto paracrino provoca cambios en la expresión de algunos de los genes relacionados con la identidad celular y la pluripotencia en las células diana. Las células que sobreexpresan Ras presentan niveles elevados de expresión de la citoquina Il6, un importante componente del SASP, con efectos descritos favoreciendo el proceso de reprogramación celular (Brady et

al., 2013; Mosteiro et al., 2016) por lo que podría ser uno de los factores solubles mediadores de este efecto.

Una vez que comprobamos que la expresión de Ras oncogénico favorece el proceso de reprogramación celular *in vitro* y que este efecto se produce de manera extrínseca promoviendo un estado más plástico en las células del entorno, quisimos analizar el efecto de la activación oncogénica durante la reprogramación *in vivo*.

La expresión de los factores OSKM *in vivo* produce eventos de reprogramación en distintos tejidos (Abad et al., 2013). Los mecanismos implicados en este proceso están todavía poco caracterizados y su estudio resulta muy valioso para entender y modular la plasticidad celular, así como para su posible futura utilización como herramienta en medicina regenerativa. Al igual que ocurre *in vitro*, existen barreras que se oponen a este cambio de identidad. Además, no todos los tejidos son igual de permisivos a la reprogramación y, a pesar de expresar los factores en respuesta a la doxiciclina, no todos logran reprogramarse. El estudio de las barreras descritas para la reprogramación *in vitro*, como la senescencia celular, se vuelve más complejo en este contexto y requiere considerar tanto aspectos intrínsecos como extrínsecos, influenciados por el contexto tisular. Recientemente se ha descubierto que la expresión de los factores *in vivo*, provoca dos tipos de respuesta en los tejidos. Por un lado, la expresión de OSKM es capaz de inducir cambios que conducen a la desdiferenciación celular, pero, por otro lado, su expresión también induce daño en el tejido. Este daño desencadena una respuesta de senescencia celular que, mediante la secreción del SASP, y en especial de Il6, favorece la reprogramación de las células vecinas (Mosteiro et al., 2016). La inducción de otros daños, como los provocados de manera fisiológica durante el envejecimiento, o los provocados mediante distintos modelos de inducción de lesiones tisulares, aumentan esta respuesta de senescencia, lo que origina un contexto más plástico que favorece la desdiferenciación e incluso llega a permitir la reprogramación de tejidos normalmente resistentes (Chiche et al., 2017; Mosteiro et al., 2016).

## DISCUSIÓN

En este trabajo, quisimos estudiar el efecto de la activación oncogénica sobre el proceso de reprogramación iniciado tras la expresión de los factores de reprogramación *in vivo*. Para ello empleamos distintos modelos de carcinogénesis; desde modelos cuyo mecanismo está muy definido a modelos más complejos o aleatorios. Empleamos un modelo definido de activación genética del cáncer basado en la activación del oncogén KrasV12 desde un alelo del gen *Kras* endógeno (Guerra et al., 2003) en el que podemos estudiar el efecto de la activación de Ras, al igual que hicimos *in vitro*. Como modelos de carcinogénesis química empleamos el tratamiento con DMBA, que constituye el primer paso de un protocolo clásico de carcinogénesis en piel y que provoca mayoritariamente mutaciones en Hras (Quintanilla et al., 1986); y la inyección de 3-MCA que provoca múltiples mutaciones aleatorias que conducen al desarrollo tumoral (Wexler and Rosenberg, 1979).

Con estos tres modelos provocamos eventos carcinogénicos en tejidos específicos: pulmón, piel y músculo, respectivamente. Estos tres tejidos, comparten la característica de que, a pesar de responder a la inducción con doxiciclina expresando los factores de reprogramación, nunca dan lugar a teratomas (Abad et al., 2013). Sin embargo, se ha demostrado que la inducción de daño en ellos genera un estado más plástico (Chiche et al., 2017; Mosteiro et al., 2016; Ritschka et al., 2017) que favorece la reprogramación.

En los tres modelos, tras la expresión de los factores OSKM, encontramos signos de desdiferenciación, como la alteración de las fibras musculares y la alteración de la estructura de la piel, con células positivas para el marcador de pluripotencia Oct4 y/o Nanog, indicativos de eventos de desdiferenciación asociados a la zona de daño. Aunque se trata de resultados preliminares, que requieren un estudio en profundidad, estos datos apuntan a que, al igual que ocurre *in vitro*, la activación oncogénica genera un estado más plástico en su entorno que favorece el cambio de identidad celular.

Los resultados de esta primera parte ponen de manifiesto un papel favorecedor de la activación oncogénica sobre el proceso de reprogramación, tanto *in vitro* como *in vivo*. La inmortalización, el

primer paso imprescindible para la transformación, supone también una ventaja para la reprogramación celular (Banito et al., 2009; Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009; Li et al., 2009; Marión et al., 2009; Utikal et al., 2009a). Ambos eventos, por separado, permiten e incluso favorecen la obtención de células iPSC. Sin embargo, al combinarse y establecer la transformación completa, dificultan la reprogramación. Por ello, a continuación, analizamos el efecto sobre la reprogramación celular, cuando esta activación oncogénica se produce en células inmortalizadas conduciendo a la transformación completa.

A pesar del evidente interés en el estudio de la reprogramación de células tumorales, existen muy pocos ejemplos exitosos de obtención de iPSC a partir de células transformadas. La mayor parte proceden de la reprogramación de células de tumores hematológicos, que se caracterizan por la presencia de alteraciones genéticas concretas (Carette et al., 2010; Kumano et al., 2012), a diferencia de otros tipos tumorales. Los intentos de reprogramación de células procedentes de otros tipos de cáncer generan, en muchas ocasiones, células que a pesar de presentar algunas de las características propias de las iPSC, no pueden considerarse verdaderas iPSC. Esto se debe a que requieren de la expresión ectópica continuada de los factores de reprogramación para mantenerse en estado indiferenciado (Kim et al., 2013) o a que el análisis de expresión las sitúa más próximas a las células parentales o a células parcialmente reprogramadas que a verdaderas iPSC (Zhang et al., 2013). Sin embargo, todavía no se han identificado las barreras propias de estas células que actúan oponiéndose a este proceso (Papapetrou, 2016; Ramos-Mejia et al., 2012).

Tratamos de abordar el estudio de la reprogramación de células tumorales partiendo de un sistema definido de transformación *in vitro* basado en la cooperación oncogénica entre Ras y la falta de p53.

En este contexto de *p53-null*, así como en células carentes de otro supresor tumoral, *Arf*, observamos que la expresión de Ras junto con los factores de reprogramación actúa oponiéndose a la obtención de iPSC.

## DISCUSIÓN

De forma análoga a cómo hicimos en el caso de los MEFs wt, quisimos determinar el efecto de la expresión de Ras en células p53-*null*. El análisis de la expresión de genes relacionados con la identidad celular muestra cómo la expresión de Ras provoca la disminución en estos marcadores. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría con las células wt, no produce cambios en los genes de pluripotencia. Además, el tratamiento con medios condicionados por células p53-*null* que expresan Ras no logra favorecer la reprogramación, e incluso la dificulta. Estos resultados en conjunto apuntan a que los cambios en la identidad celular producidos por Ras no son suficientes para entender el efecto de aumento de la reprogramación que hemos descrito anteriormente.

Para profundizar en este efecto, desarrollamos un sistema de transformación reversible, basado en la falta de p53 y la expresión inducible de Ras, con el que poder alternar entre los estados de inmortalización y transformación. El empleo de este sistema en reprogramación nos permitió comprobar que el efecto de la transformación oncogénica sobre el proceso de reprogramación es, al menos durante las etapas iniciales, reversible. Con el apagado de uno de los estímulos oncogénicos, las células revierten su estado transformado y pueden reprogramarse de manera eficiente, lo que concuerda con el fenómeno de adición oncogénica descrito para la transformación (Chin et al., 1999). La reprogramación de células tumorales tras el apagado de uno de los estímulos oncogénicos se había reportado anteriormente en un modelo inducible de osteosarcoma (Komura et al., 2016), aunque en este trabajo no se compara la capacidad de reprogramación entre el estado transformado y el inmortalizado. Al inyectar estas células en ratones para estudiar su comportamiento *in vivo*, observamos que en estado transformado forman tumores agresivos, a pesar de expresar los factores. Sin embargo, cuando se apaga la expresión de Ras, dan lugar, con una incidencia menor, a teratomas, indicativos de la reprogramación.

Estos resultados nos indican que al menos alguna de las barreras que se oponen a la reprogramación de células transformadas es el resultado de la combinación de estos eventos oncogénicos. Este sistema podría resultar de gran interés para identificar las barreras

específicas del estado transformado que se oponen a la reprogramación, al permitir alternar entre los estados de immortalización y transformación de una forma rápida. Es necesario tener en cuenta que tras un mayor tiempo en estado transformado, estas células podrían adquirir nuevas alteraciones que establezcan una identidad tumoral más fuerte y estable que impida esta reversión.

Para continuar con el estudio de la reprogramación de células tumorales, decidimos emplear un sistema de transformación más complejo, basado en líneas celulares derivadas de fibrosarcomas generados tras la inyección de 3-MCA en ratones reprogramables.

Una vez derivadas las líneas celulares, y antes de someterlas al proceso de reprogramación *in vitro*, comprobamos la expresión de los factores de reprogramación en respuesta al tratamiento con el inductor. Sorprendentemente, encontramos que, de las cuatro líneas transgénicas obtenidas, solo una de ellas expresaba los factores OSKM, y lo hace a niveles inferiores a los obtenidos en los MEFs i4F empleados como control. Estos resultados podrían deberse a que estas células silencien la expresión del transgén para evitar un posible efecto negativo de la expresión de OSKM sobre el crecimiento de las células tumorales. Este silenciamiento podría ocurrir incluso antes de haber sido tratadas con el inductor en respuesta a una pequeña, aunque detectable, fuga de expresión del casete transgénico que ha sido reportada con anterioridad (Vilas et al., 2015).

A pesar de esto, quisimos evaluar la reprogramación de estas células *in vitro*. Como cabría esperar, la línea analizada que no responde a la doxiciplina no forma ninguna colonia de iPSC. Por su parte, la línea que responde a la activación con el inductor, aunque a niveles bajos, tampoco logra reprogramarse.

Para evitar el silenciamiento del transgén, optamos por generar nuevas líneas reconstituídas *in vitro*, mediante la transducción de líneas de fibrosarcoma wt con los lentivirus que expresan OSKM y rtTA. Estas nuevas líneas expresan los factores de reprogramación en respuesta al inductor a niveles similares a los obtenidos en los MEFs control. Sin embargo, pese a ello, son incapaces de reprogramarse. Sólo una de las líneas logró dar lugar a un bajo número de colonias

## DISCUSIÓN

positivas para el marcador AP, aunque estas necesitarían ser caracterizadas en profundidad para comprobar si se trata de verdaderas iPSC. Estudios previos con células de sarcomas muestran que tras el proceso de reprogramación, las células resultantes, a pesar de cumplir algunas de las características propias de las células iPS, como la morfología o la presencia de actividad AP, presentan un perfil de expresión más similar al de las células parentales o células parcialmente reprogramadas que a verdaderas iPSC (Zhang et al., 2013).

Durante el experimento de reprogramación *in vitro* observamos que la expresión de los factores desencadenó una respuesta de muerte celular específicamente en las líneas de fibrosarcoma que expresan los factores OSKM, mientras que los MEFs empleados como control no sufrieron ningún problema, por lo que parece ser una respuesta específica de las células tumorales. Este hecho, junto con la observación del silenciamiento del transgén en las líneas transgénicas, nos hace plantearnos la posible existencia de incompatibilidad entre el estado transformado y el cambio de identidad requerido en reprogramación. Así, las células transformadas tratarían de mantener su identidad celular inalterada mediante distintos mecanismos que deberían ser estudiados en detalle.

Cuando inyectamos estas células en ratones inmunodeficientes para testar si eran capaces de formar teratomas tras la expresión de los factores *in vivo*, comprobamos mediante análisis histológico y mediante análisis de expresión, que no se produjo la reprogramación en ninguna de las líneas analizadas. Sin embargo, el seguimiento de los ratones tras la inyección subcutánea de las células nos permitió observar una tendencia hacia un menor crecimiento de los tumores que expresan los factores OSKM, tanto en la línea transgénica respondedora como en las wt reconstituídas, cuando las comparábamos con sus respectivos controles.

Quisimos analizar ese efecto en detalle, por lo que realizamos un nuevo experimento en el que aumentamos el número de líneas testadas y registramos el crecimiento tumoral. Debido a la variabilidad existente entre las distintas líneas de fibrosarcoma, no encontramos

diferencias significativas entre los grupos establecidos en base a la expresión, o no, de los factores. Sin embargo, observamos de nuevo una tendencia hacia un menor crecimiento tumoral en las células que expresan los factores. En el caso de las líneas wt reconstituidas observamos una tendencia a generar tumores de un tamaño inferior al obtenido con el grupo control. Estudiar las características diferenciales entre los tumores control y los que ven dificultada su progresión debido a la expresión de OSKM, podría resultar de utilidad para identificar mecanismos que actúan frenando el desarrollo tumoral.

Estos resultados no solo muestran una incompatibilidad entre los procesos de reprogramación y transformación, sino que, además, parecen indicar que la expresión de los factores en las células de fibrosarcoma disminuye su capacidad tumorigénica. Esto concordaría con lo publicado por Zhang et al. (Zhang et al., 2013) con distintas líneas de sarcomas, en las que la expresión de los factores de reprogramación, aunque sin alcanzar la pluripotencia, logra disminuir su tumorigenicidad al restaurar la capacidad de diferenciación defectiva en las células tumorales parentales. Esto puede deberse a que la reprogramación consigue revertir el patrón de metilación y transcripción aberrante de las células tumorales, como se demostró con la reprogramación de células tumorales de pulmón (Mahalingam et al., 2012).

En conjunto, este trabajo muestra como la activación oncogénica, cuando se produce en un contexto previo al desarrollo tumoral, genera un estado celular más plástico, que facilita la reprogramación celular. Sin embargo, una vez establecida la transformación completa, mediante cooperación entre distintos eventos oncogénicos, las células adquieren una nueva identidad tumoral que se opone a la reprogramación hacia pluripotencia.

Los mecanismos comunes que regulan los procesos de reprogramación y transformación oncogénica, sitúan a la célula somática, en respuesta a la activación de estos mecanismos, en un balance entre ambos procesos. Sin embargo, el desequilibrio hacia un lado u otro acaba por establecer identidades celulares, la pluripotencia o la tumorigenicidad, incompatibles entre sí y excluyentes. La

## DISCUSIÓN

identificación de los mecanismos que se oponen a la reprogramación en las células tumorales resultaría de gran interés para comprender mejor su identidad celular y para desarrollar nuevas estrategias que permitan modularla con fines terapéuticos.



# CONCLUSIONES





1. La expresión de la forma activa del oncogén Ras favorece el proceso de reprogramación celular mediante la activación de la vía de MAPK/ERK.
2. La vía de RAS/MAPK/ERK se activa de manera endógena durante la reprogramación celular.
3. La expresión de Ras promueve cambios transcripcionales en genes de identidad celular y de pluripotencia.
4. Ras estimula la reprogramación celular de manera extrínica.
5. La activación oncogénica *in vivo* favorece la desdiferenciación celular.
6. La activación oncogénica en el contexto de transformación celular dificulta la reprogramación celular.
7. La expresión de Ras en células transformadas es capaz de inducir cambios transcripcionales en genes de identidad celular pero no de inducir la expresión de genes de pluripotencialidad.
8. La reversión del estado transformado, mediante el apagado de la expresión de Ras, permite la reprogramación celular.
9. La expresión de los factores de reprogramación en líneas tumorales no permite su reprogramación.
10. La expresión de los factores de reprogramación *in vivo* parece suponer un obstáculo para el crecimiento tumoral.



# **BIBLIOGRAFÍA**





Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Cañamero, M., Rayon, T., Ors, I., Graña, O., Megías, D., Domínguez, O., Martínez, D., et al. (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* 502, 340–345.

Abel, E.L., Angel, J.M., Kiguchi, K., and DiGiovanni, J. (2009). Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: Fundamentals and applications. *Nat. Protoc.* 4, 1350–1362.

Aktas, H., Cai, H., and Cooper, G.M. (1997). Ras links growth factor signaling to the cell cycle machinery via regulation of cyclin D1 and the Cdk inhibitor p27KIP1. *Mol. Cell. Biol.* 17, 3850–3857.

Alexander, E., Hildebrand, D.G., Kriebs, A., Obermayer, K., Manz, M., Rothfuss, O., Schulze-Osthoff, K., and Essmann, F. (2013). I $\kappa$ B $\zeta$  is a regulator of the senescence-associated secretory phenotype in DNA damage- and oncogene-induced senescence. *J. Cell Sci.* 126, 3738–3745.

Apostolou, E., and Hochedlinger, K. (2013). Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature* 502, 462–471.

Ballester, R., Marchuk, D., Boguski, M., Saulino, A., Letcher, R., Wigler, M., and Collins, F. (1990). The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins. *Cell* 63, 851–859.

Banito, A., Rashid, S.T., Acosta, J.C., Li, S., Pereira, C.F., Geti, I., Pinho, S., Silva, J.C., Azuara, V., Walsh, M., et al. (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev.* 23, 2134–2139.

Barbacid, M. (1987). ras Genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 779–827.

Barrett, S.D., Bridges, A.J., Dudley, D.T., Saltiel, A.R., Fergus, J.H., Flamme, C.M., Delaney, A.M., Kaufman, M., LePage, S., Leopold, W.R., et al. (2008). The discovery of the benzhydroxamate MEK inhibitors CI-1040 and PD 0325901. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 18, 6501–6504.

Ben-Porath, I., Thomson, M.W., Carey, V.J., Ge, R., Bell, G.W.,

## BIBLIOGRAFÍA

Regev, A., and Weinberg, R.A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat. Genet.* *40*, 499–507.

Beroukhim, R., Mermel, C.H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J.S., Dobson, J., Urashima, M., et al. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* *463*, 899–905.

Besson, A., Dowdy, S.F., and Roberts, J.M. (2008). CDK Inhibitors: Cell Cycle Regulators and Beyond. *Dev. Cell* *14*, 159–169.

Blau, H.M., Chiu, C.P., and Webster, C. (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons. *Cell* *32*, 1171–1180.

Blalloch, R.H., Hochedlinger, K., Yamada, Y., Brennan, C., Kim, M., Mintz, B., Chin, L., and Jaenisch, R. (2004). Nuclear cloning of embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *101*, 13985–13990.

Bowtell, D., Fu, P., Simon, M., and Senior, P. (1992). Identification of murine homologues of the *Drosophila* son of sevenless gene: potential activators of ras. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 6511–6515.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248–254.

Brady, C.A., and Attardi, L.D. (2010). p53 at a glance. *J. Cell Sci.* *123*, 2527–2532.

Brady, J.J., Li, M., Suthram, S., Jiang, H., Wong, W.H., and Blau, H.M. (2013). Early role for IL-6 signalling during generation of induced pluripotent stem cells revealed by heterokaryon RNA-Seq. *Nat. Cell Biol.* *15*, 1244–1252.

Broek, D., Toda, T., Michaeli, T., Levin, L., Birchmeier, C., Zoller, M., Powers, S., and Wigler, M. (1987). The *S. cerevisiae* CDC25 gene product regulates the RAS/adenylate cyclase pathway. *Cell* *48*, 789–799.

Burkhart, D.L., and Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer* 8, 671–682.

Cao, F., van der Bogt, K.E.A., Sadrzadeh, A., Xie, X., Sheikh, A.Y., Wang, H., Connolly, A.J., Robbins, R.C., and Wu, J.C. (2007). Spatial and temporal kinetics of teratoma formation from murine embryonic stem cell transplantation. *Stem Cells Dev.* 16, 883–891.

Carette, J.E., Pruszk, J., Varadarajan, M., Blomen, V.A., Gokhale, S., Camargo, F.D., Wernig, M., Jaenisch, R., and Brummelkamp, T.R. (2010). Generation of iPSCs from cultured human malignant cells. *Blood* 115, 4039–4042.

Carey, B.W., Markoulaki, S., Beard, C., Hanna, J., and Jaenisch, R. (2009). Single-gene transgenic mouse strains for reprogramming adult somatic cells. *Nat. Methods* 7, 56–59.

Chiche, A., Le Roux, I., von Joest, M., Sakai, H., Aguin, S.B., Cazin, C., Salam, R., Fiette, L., Alegria, O., Flamant, P., et al. (2017). Injury-Induced Senescence Enables In Vivo Reprogramming in Skeletal Muscle. *Cell Stem Cell* 20, 407–414.e4.

Chien, Y., and White, M.A. (2003). RAL GTPases are linchpin modulators of human tumour-cell proliferation and survival. *EMBO Rep.* 4, 800–806.

Chin, L., Tam, A., Pomerantz, J., Wong, M., Holash, J., Bardeesy, N., Shen, Q., O'Hagan, R., Pantginis, J., Zhou, H., et al. (1999). Essential role for oncogenic Ras in tumour maintenance. *Nature* 400, 468–472.

Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nat. Rev. Cancer* 10, 51–57.

Collado, M., Gil, J., Efeyan, A., Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J.M., Barbacid, M., et al. (2005). Tumour biology: Senescence in premalignant tumours. *Nature* 436, 642–642.

Collado, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Cellular Senescence in Cancer and Aging. *Cell* 130, 223–233.

## BIBLIOGRAFÍA

Coppé, J.-P., Desprez, P.-Y., Krtolica, A., and Campisi, J. (2010). The Senescence-Associated Secretory Phenotype: The Dark Side of Tumor Suppression. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 5, 99–118.

Cox, A.D., and Der, C.J. (2003). The dark side of Ras: regulation of apoptosis. *Oncogene* 22, 8999–9006.

Cox, A.D., and Der, C.J. (2010). Ras history. *Small GTPases* 1, 2–27.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., et al. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949–954.

Dawson, M.A., and Kouzarides, T. (2012). Cancer Epigenetics: From Mechanism to Therapy. *Cell* 150, 12–27.

Der, C.J., Krontiris, T.G., and Cooper, G.M. (1982). Transforming genes of human bladder and lung carcinoma cell lines are homologous to the ras genes of Harvey and Kirsten sarcoma viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 3637–3640.

Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., and Pereira-Smith, O. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 9363–9367.

Downward, J. (1998). Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 262–267.

Filmus, J., Robles, A.I., Shi, W., Wong, M.J., Colombo, L.L., and Conti, C.J. (1994). Induction of cyclin D1 overexpression by activated ras. *Oncogene* 9, 3627–3633.

Franke, B., Akkerman, J.W., and Bos, J.L. (1997). Rapid Ca<sup>2+</sup>-mediated activation of Rap1 in human platelets. *EMBO J.* 16, 252–259.

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem

cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.* *85*, 348–362.

Gartel, A.L., and Tyner, A.L. (1999). Transcriptional Regulation of the p21(WAF1/CIP1)Gene. *Exp. Cell Res.* *246*, 280–289.

Gibbs, J.B., Sigal, I.S., Poe, M., and Scolnick, E.M. (1984). Intrinsic GTPase activity distinguishes normal and oncogenic ras p21 molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 5704–5708.

Gidekel, S., Pizov, G., Bergman, Y., and Pikarsky, E. (2003). Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell* *4*, 361–370.

Greenow, K., and Clarke, A.R. (2012). Controlling the Stem Cell Compartment and Regeneration In Vivo: The Role of Pluripotency Pathways. *Physiol. Rev.* *92*, 75–99.

Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., and Barbacid, M. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell* *4*, 111–120.

Gupta, P.B., Chaffer, C.L., and Weinberg, R.A. (2009). Cancer stem cells: mirage or reality? *Nat. Med.* *15*, 1010–1012.

Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* *10*, 622–640.

Halevy, O., Rodel, J., Peled, A., and Oren, M. (1991). Frequent p53 mutations in chemically induced murine fibrosarcoma. *Oncogene* *6*, 1593–1600.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.

Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C.J., Creighton, M.P., van Oudenaarden, A., and Jaenisch, R. (2009).

## BIBLIOGRAFÍA

Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* *462*, 595–601.

Hayflick, L. (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* *37*, 614–636.

Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N., and Depinho, R.A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* *20*, 1218–1249.

Hochedlinger, K., Blalock, R., Brennan, C., Yamada, Y., Kim, M., Chin, L., and Jaenisch, R. (2004). Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. *Genes Dev.* *18*, 1875–1885.

Hochedlinger, K., Yamada, Y., Beard, C., and Jaenisch, R. (2005). Ectopic Expression of Oct-4 Blocks Progenitor-Cell Differentiation and Causes Dysplasia in Epithelial Tissues. *Cell* *121*, 465–477.

Hockemeyer, D., Soldner, F., Cook, E.G., Gao, Q., Mitalipova, M., and Jaenisch, R. (2008). A Drug-Inducible System for Direct Reprogramming of Human Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell* *3*, 346–353.

Hofer, F., Fields, S., Schneider, C., and Martin, G.S. (1994). Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 11089–11093.

Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., and Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* *460*, 1132–1135.

Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., Zhao, T., Ye, J., Yang, W., Liu, K., et al. (2013). Pluripotent Stem Cells Induced from Mouse Somatic Cells by Small-Molecule Compounds. *Science* (80-. ). *341*, 651–654.

Ischenko, I., Zhi, J., Moll, U.M., Nemajerova, A., and Petrenko, O. (2013). Direct reprogramming by oncogenic Ras and Myc. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 3937–3942.

Islam, F., Qiao, B., Smith, R.A., Gopalan, V., and Lam, A.K.-Y. (2015). Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. *Exp. Mol. Pathol.* 98, 184–191.

Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y. V, Menendez, S., Morera, L.B., Raya, A., Wahl, G.M., and Izpisua Belmonte, J.C. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460, 1140–1144.

Kelley, G.G., Reks, S.E., Ondrako, J.M., and Smrcka, A. V (2001). Phospholipase Cepsilon: a novel Ras effector. *EMBO J.* 20, 743–754.

Kerkhoff, E., and Rapp, U.R. (1998). Cell cycle targets of Ras/Raf signalling. *Oncogene* 17, 1457–1462.

Kikuchi, A., Demo, S.D., Ye, Z.H., Chen, Y.W., and Williams, L.T. (1994). ralGDS family members interact with the effector loop of ras p21. *Mol. Cell. Biol.* 14, 7483–7491.

Kim, J., and Zaret, K.S. (2015). Reprogramming of human cancer cells to pluripotency for models of cancer progression. *EMBO J.* 34, 739–747.

Kim, W.Y., and Sharpless, N.E. (2006). The Regulation of INK4/ARF in Cancer and Aging. *Cell* 127, 265–275.

Kim, D.H., Marinov, G.K., Pepke, S., Singer, Z.S., He, P., Williams, B., Schroth, G.P., Elowitz, M.B., and Wold, B.J. (2015). Single-cell transcriptome analysis reveals dynamic changes in lncRNA expression during reprogramming. *Cell Stem Cell* 16, 88–101.

Kim, J., Hoffman, J.P., Alpaugh, R.K., Rhim, A.D., Reichert, M., Stanger, B.Z., Furth, E.E., Sepulveda, A.R., Yuan, C.-X., Won, K.-J., et al. (2013). An iPSC Line from Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Undergoes Early to Invasive Stages of Pancreatic Cancer Progression. *Cell Rep.* 3, 2088–2099.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M.J., Ji, H., Ehrlich, L.I.R., et al. (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467, 285–290.

## BIBLIOGRAFÍA

Komura, S., Semi, K., Itakura, F., Shibata, H., Ohno, T., Hotta, A., Woltjen, K., Yamamoto, T., Akiyama, H., and Yamada, Y. (2016). An EWS-FLI1-Induced Osteosarcoma Model Unveiled a Crucial Role of Impaired Osteogenic Differentiation on Osteosarcoma Development. *Stem Cell Reports* 6, 592–606.

Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L., and Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *J. Clin. Invest.* 114, 1299–1307.

Krizhanovsky, V., and Lowe, S.W. (2009). The promises and perils of p53. *Nature* 460, 1085–1086.

Kumano, K., Arai, S., Hosoi, M., Taoka, K., Takayama, N., Otsu, M., Nagae, G., Ueda, K., Nakazaki, K., Kamikubo, Y., et al. (2012). Generation of induced pluripotent stem cells from primary chronic myelogenous leukemia patient samples. *Blood* 119, 6234–6242.

Kwon, Y.-W., Jang, S., Paek, J.-S., Lee, J.-W., Cho, H.-J., Yang, H.-M., and Kim, H.-S. (2015). E-Ras improves the efficiency of reprogramming by facilitating cell cycle progression through JNK–Spl pathway. *Stem Cell Res.* 15, 481–494.

Lambert, J.M., Lambert, Q.T., Reuther, G.W., Malliri, A., Siderovski, D.P., Sondek, J., Collard, J.G., and Der, C.J. (2002). Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat. Cell Biol.* 4, 621–625.

Land, H., Parada, L.F., and Weinberg, R.A. (1983). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596–602.

Lane, D.P. (1992). p53, guardian of the genome. *Nature* 358, 15–16.

Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645–648.

Latres, E., Malumbres, M., Sotillo, R., Martín, J., Ortega, S., Martín-Caballero, J., Flores, J.M., Cerdón-Cardo, C., and Barbacid, M. (2006). The Ink4a/Arf locus is a tumor suppressor. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2, 526–537.

M. (2000). Limited overlapping roles of P15(INK4b) and P18(INK4c) cell cycle inhibitors in proliferation and tumorigenesis. *EMBO J.* *19*, 3496–3506.

Leever, S.J., and Marshall, C.J. (1992). Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21ras oncoprotein. *EMBO J.* *11*, 569–574.

Li, H., Collado, M., Villasante, A., Strati, K., Ortega, S., Cañamero, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2009). The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* *460*, 1136–1139.

Li, H., Collado, M., Villasante, A., Matheu, A., Lynch, C.J., Cañamero, M., Rizzoti, K., Carneiro, C., Martínez, G., Vidal, A., et al. (2012). p27(Kip1) directly represses Sox2 during embryonic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell* *11*, 845–852.

Li, L., Connelly, M.C., Wetmore, C., Curran, T., and Morgan, J.I. (2003). Mouse embryos cloned from brain tumors. *Cancer Res.* *63*, 2733–2736.

Liu, P., Chen, M., Liu, Y., Qi, L.S., and Ding, S. (2018). CRISPR-Based Chromatin Remodeling of the Endogenous Oct4 or Sox2 Locus Enables Reprogramming to Pluripotency. *Cell Stem Cell* *22*, 252–261.e4.

Lois, C., Hong, E.J., Pease, S., Brown, E.J., and Baltimore, D. (2002). Germline Transmission and Tissue-Specific Expression of Transgenes Delivered by Lentiviral Vectors. *Science* (80- ). *295*, 868–872.

De Los Angeles, A., Ferrari, F., Xi, R., Fujiwara, Y., Benvenisty, N., Deng, H., Hochedlinger, K., Jaenisch, R., Lee, S., Leitch, H.G., et al. (2015). Hallmarks of pluripotency. *Nature* *525*, 469–478.

Mahalingam, D., Kong, C.M., Lai, J., Tay, L.L., Yang, H., and Wang, X. (2012). Reversal of aberrant cancer methylome and transcriptome upon direct reprogramming of lung cancer cells. *Sci. Rep.* *2*, 592.

Malumbres, M., and Barbacid, M. (2003). Timeline: RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* *3*, 459–465.

## BIBLIOGRAFÍA

Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2007). AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. *Cell* 129, 1261–1274.

Marión, R.M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460, 1149–1153.

Marjanovic, N.D., Weinberg, R.A., and Chaffer, C.L. (2013). Cell Plasticity and Heterogeneity in Cancer. *Clin. Chem.* 59, 168–179.

Martegani, E., Vanoni, M., Zippel, R., Coccetti, P., Brambilla, R., Ferrari, C., Sturani, E., and Alberghina, L. (1992). Cloning by functional complementation of a mouse cDNA encoding a homologue of CDC25, a *Saccharomyces cerevisiae* RAS activator. *EMBO J.* 11, 2151–2157.

Martin, G.A., Viskochil, D., Bollag, G., McCabe, P.C., Crosier, W.J., Haubruck, H., Conroy, L., Clark, R., O'Connell, P., and Cawthon, R.M. (1990). The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell* 63, 843–849.

Martinez, R., Martin-Subero, J.I., Rohde, V., Kirsch, M., Alaminos, M., Fernández, A.F., Ropero, S., Schackert, G., and Esteller, M. (2009). A microarray-based DNA methylation study of glioblastoma multiforme. *Epigenetics* 4, 255–264.

Matheu, A., Pantoja, C., Efeyan, A., Criado, L.M., Martín-Caballero, J., Flores, J.M., Klatt, P., and Serrano, M. (2004). Increased gene dosage of *Ink4a/Arf* results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev.* 18, 2736–2746.

McCormick, F. (1993). How receptors turn Ras on. *Nature* 363, 15–16.

McGrath, J.P., Capon, D.J., Goeddel, D. V., and Levinson, A.D. (1984). Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein. *Nature* 310, 644–649.

Meerbrey, K.L., Hu, G., Kessler, J.D., Roarty, K., Li, M.Z., Fang, J.E., Herschkowitz, J.I., Burrows, A.E., Ciccia, A., Sun, T., et al.

(2011). The pINDUCER lentiviral toolkit for inducible RNA interference in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 3665–3670.

Melo, J. V., and Barnes, D.J. (2007). Chronic myeloid leukaemia as a model of disease evolution in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 7, 441–453.

Milanovic, M., Fan, D.N.Y., Belenki, D., Däbritz, J.H.M., Zhao, Z., Yu, Y., Dörr, J.R., Dimitrova, L., Lenze, D., Monteiro Barbosa, I.A., et al. (2017). Senescence-associated reprogramming promotes cancer stemness. *Nature* 553, 96–100.

Miyoshi, N., Ishii, H., Nagai, K., Hoshino, H., Mimori, K., Tanaka, F., Nagano, H., Sekimoto, M., Doki, Y., and Mori, M. (2010). Defined factors induce reprogramming of gastrointestinal cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 40–45.

Moodie, S.A., Willumsen, B.M., Weber, M.J., and Wolfman, A. (1993). Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* 260, 1658–1661.

Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2006). Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N. Engl. J. Med.* 355, 1037–1046.

Mosteiro, L., Pantoja, C., Alcazar, N., Marión, R.M., Chondronasiou, D., Rovira, M., Fernandez-Marcos, P.J., Muñoz-Martin, M., Blanco-Aparicio, C., Pastor, J., et al. (2016). Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science* (80-. ). 354, aaf4445.

Mosteiro, L., Pantoja, C., de Martino, A., and Serrano, M. (2017). Senescence promotes in vivo reprogramming through p16<sup>INK4a</sup> and IL-6. *Aging Cell* e12711.

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 26, 101–106.

## BIBLIOGRAFÍA

Naviaux, R.K., Costanzi, E., Haas, M., and Verma, I.M. (1996). The pCL vector system: rapid production of helper-free, high-titer, recombinant retroviruses. *J. Virol.* 70, 5701–5705.

Newbold, R.F., and Overell, R.W. (1983). Fibroblast immortality is a prerequisite for transformation by EJ c-Ha-ras oncogene. *Nature* 304, 648–651.

Nishimura, K., Sano, M., Ohtaka, M., Furuta, B., Umemura, Y., Nakajima, Y., Ikehara, Y., Kobayashi, T., Segawa, H., Takayasu, S., et al. (2011). Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J. Biol. Chem.* 286, 4760–4771.

Ocampo, A., Reddy, P., Martinez-Redondo, P., Platero-Luengo, A., Hatanaka, F., Hishida, T., Li, M., Lam, D., Kurita, M., Beyret, E., et al. (2016). In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell* 167, 1719–1733.e12.

Ohnishi, K., Semi, K., Yamamoto, T., Shimizu, M., Tanaka, A., Mitsunaga, K., Okita, K., Osafune, K., Arioka, Y., Maeda, T., et al. (2014). Premature Termination of Reprogramming In Vivo Leads to Cancer Development through Altered Epigenetic Regulation. *Cell* 156, 663–677.

Onder, T.T., Kara, N., Cherry, A., Sinha, A.U., Zhu, N., Bernt, K.M., Cahan, P., Marcarci, B.O., Unternaehrer, J., Gupta, P.B., et al. (2012). Chromatin-modifying enzymes as modulators of reprogramming. *Nature* 483, 598–602.

Papapetrou, E.P. (2016). Patient-derived induced pluripotent stem cells in cancer research and precision oncology. *Nat. Med.* 22, 1392–1401.

Parada, L.F., Tabin, C.J., Shih, C., and Weinberg, R.A. (1982). Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297, 474–478.

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

factors. *Nature* 451, 141–146.

Polo, J.M., Anderssen, E., Walsh, R.M., Schwarz, B.A., Nefzger, C.M., Lim, S.M., Borkent, M., Apostolou, E., Alaei, S., Cloutier, J., et al. (2012). A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* 151, 1617–1632.

Prieto, J., León, M., Ponsoda, X., Sendra, R., Bort, R., Ferrer-Lorente, R., Raya, A., López-García, C., and Torres, J. (2016). Early ERK1/2 activation promotes DRP1-dependent mitochondrial fission necessary for cell reprogramming. *Nat. Commun.* 7, 11124.

Pylayeva-Gupta, Y., Grabocka, E., and Bar-Sagi, D. (2011). RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. *Nat. Rev. Cancer* 11, 761–774.

Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M., and Balmain, A. (1986). Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 322, 78–80.

Ramos-Mejia, V., Fraga, M.F., and Menendez, P. (2012). iPSCs from cancer cells: challenges and opportunities. *Trends Mol. Med.* 18, 245–247.

Rangarajan, A., Hong, S.J., Gifford, A., and Weinberg, R.A. (2004). Species- and cell type-specific requirements for cellular transformation. *Cancer Cell* 6, 171–183.

Ritschka, B., Storer, M., Mas, A., Heinzmann, F., Ortells, M.C., Morton, J.P., Sansom, O.J., Zender, L., and Keyes, W.M. (2017). The senescence-associated secretory phenotype induces cellular plasticity and tissue regeneration. *Genes Dev.* 31, 172–183.

Robinson, L.C., Gibbs, J.B., Marshall, M.S., Sigal, I.S., and Tatchell, K. (1987). CDC25: a component of the RAS-adenylate cyclase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 235, 1218–1221.

Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M.J., Waterfield, M.D., and Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase direct target of Ras. *Nature* 370, 527–532.

## BIBLIOGRAFÍA

Rodriguez-Viciano, P., Warne, P.H., Khwaja, A., Marte, B.M., Pappin, D., Das, P., Waterfield, M.D., Ridley, A., and Downward, J. (1997). Role of Phosphoinositide 3-OH Kinase in Cell Transformation and Control of the Actin Cytoskeleton by Ras. *Cell* 89, 457–467.

Rony, I.K., Baten, A., Bloomfield, J.A., Islam, M.E., Billah, M.M., and Islam, K.D. (2015). Inducing pluripotency *in vitro* : recent advances and highlights in induced pluripotent stem cells generation and pluripotency reprogramming. *Cell Prolif.* 48, 140–156.

Rowland, B.D., and Peeper, D.S. (2006). KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 11–23.

Ruley, H.E. (1983). Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* 304, 602–606.

Santos, E., Tronick, S.R., Aaronson, S.A., Pulciani, S., and Barbacid, M. (1982). T24 human bladder carcinoma oncogene is an activated form of the normal human homologue of BALB- and Harvey-MSV transforming genes. *Nature* 298, 343–347.

Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593–602.

Sharpless, N.E., Ramsey, M.R., Balasubramanian, P., Castrillon, D.H., and DePinho, R.A. (2004). The differential impact of p16 INK4a or p19 ARF deficiency on cell growth and tumorigenesis. *Oncogene* 23, 379–385.

Sherr, C.J. (2012). Ink4-Arf locus in cancer and aging. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 1, 731–741.

Sherr, C.J., and Roberts, J.M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512.

Shou, C., Farnsworth, C.L., Neel, B.G., and Feig, L.A. (1992). Molecular cloning of cDNAs encoding a guanine-nucleotide-releasing factor for Ras p21. *Nature* 358, 351–354.

Sjölander, A., Yamamoto, K., Huber, B.E., and Lapetina, E.G. (1991). Association of p21ras with phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 7908–7912.

Spaargaren, M., and Bischoff, J.R. (1994). Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras, and Rap. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 12609–12613.

Stricker, S.H., Feber, A., Engström, P.G., Carén, H., Kurian, K.M., Takashima, Y., Watts, C., Way, M., Dirks, P., Bertone, P., et al. (2013). Widespread resetting of DNA methylation in glioblastoma-initiating cells suppresses malignant cellular behavior in a lineage-dependent manner. *Genes Dev.* *27*, 654–669.

Suvà, M.L., Riggi, N., and Bernstein, B.E. (2013). Epigenetic reprogramming in cancer. *Science* *339*, 1567–1570.

Sweet, R.W., Yokoyama, S., Kamata, T., Feramisco, J.R., Rosenberg, M., and Gross, M. (1984). The product of ras is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature* *311*, 273–275.

Tada, M., Tada, T., Lefebvre, L., Barton, S.C., and Surani, M.A. (1997). Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J.* *16*, 6510–6520.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* *126*, 663–676.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *17*, 183–193.

Takahashi, K., Mitsui, K., and Yamanaka, S. (2003). Role of ERas in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature* *423*, 541–545.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* *131*,

## BIBLIOGRAFÍA

861–872.

Tokuzawa, Y., Kaiho, E., Maruyama, M., Takahashi, K., Mitsui, K., Maeda, M., Niwa, H., and Yamanaka, S. (2003). Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. *Mol. Cell. Biol.* 23, 2699–2708.

Trahey, M., Wong, G., Halenbeck, R., Rubinfeld, B., Martin, G.A., Ladner, M., Long, C.M., Crosier, W.J., Watt, K., and Koths, K. (1988). Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta. *Science* 242, 1697–1700.

Utikal, J., Polo, J.M., Stadtfeld, M., Maherali, N., Kulalert, W., Walsh, R.M., Khalil, A., Rheinwald, J.G., and Hochedlinger, K. (2009a). Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* 460, 1145–1148.

Utikal, J., Maherali, N., Kulalert, W., and Hochedlinger, K. (2009b). Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J. Cell Sci.* 122, 3502–3510.

Vilas, J.M., Ferreirós, A., Carneiro, C., Morey, L., Da Silva-Álvarez, S., Fernandes, T., Abad, M., Di Croce, L., García-Caballero, T., Serrano, M., et al. (2015). Transcriptional regulation of Sox2 by the retinoblastoma family of pocket proteins. *Oncotarget* 6, 2992–3002.

Vogel, U.S., Dixon, R.A.F., Schaber, M.D., Diehl, R.E., Marshall, M.S., Scolnick, E.M., Sigal, I.S., and Gibbs, J.B. (1988). Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic ras p21. *Nature* 335, 90–93.

Vojtek, A.B., Hollenberg, S.M., and Cooper, J.A. (1993). Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74, 205–214.

Waddington C. H. (1957). The strategy of the genes : a discussion of some aspects of theoretical biology.

Wallace, M.R., Marchuk, D.A., Andersen, L.B., Letcher, R., Odeh, H.M., Saulino, A.M., Fountain, J.W., Brereton, A., Nicholson,

- J., and Mitchell, A.L. (1990). Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science* 249, 181–186.
- Wang, J., Xie, L.Y., Allan, S., Beach, D., and Hannon, G.J. (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev.* 12, 1769–1774.
- Warne, P.H., Vician, P.R., and Downward, J. (1993). Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* 364, 352–355.
- Warren, L., Manos, P.D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P.K., Smith, Z.D., Meissner, A., et al. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7, 618–630.
- Watanabe, H., Shimokado, K., Asahara, T., Dohi, K., and Niwa, O. (1999). Analysis of the c-myc, K-ras and p53 genes in methylcholanthrene-induced mouse sarcomas. *Jpn. J. Cancer Res.* 90, 40–47.
- Wei, W., Mosteller, R.D., Sanyal, P., Gonzales, E., McKinney, D., Dasgupta, C., Li, P., Liu, B.X., and Broek, D. (1992). Identification of a mammalian gene structurally and functionally related to the CDC25 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 7100–7104.
- Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323–330.
- Wexler, H., and Rosenberg, S.A. (1979). Pulmonary metastases from autochthonous 3-methylcholanthrene-induced murine tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* 63, 1393–1395.
- Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., and Campbell, K.H.S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810–813.
- Wood, K.W., Sarnecki, C., Roberts, T.M., and Blenis, J. (1992). ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell* 68,

## BIBLIOGRAFÍA

1041–1050.

Wuebben, E.L., Rizzino, A., Wuebben, E.L., and Rizzino, A. (2017). The dark side of SOX2: cancer - a comprehensive overview. *Oncotarget* 8, 44917–44943.

Xu, G.F., O'Connell, P., Viskochil, D., Cawthon, R., Robertson, M., Culver, M., Dunn, D., Stevens, J., Gesteland, R., and White, R. (1990). The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP. *Cell* 62, 599–608.

Yilmazer, A., de Lázaro, I., and Taheri, H. (2015). Reprogramming cancer cells: A novel approach for cancer therapy or a tool for disease-modeling? *Cancer Lett.* 369, 1–8.

Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P., and Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453, 519–523.

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* (80-. ). 318, 1917–1920.

Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. (2009). Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science* (80-. ). 324, 797–801.

Yu, Y., Liang, D., Tian, Q., Chen, X., Jiang, B., Chou, B.-K., Hu, P., Cheng, L., Gao, P., Li, J., et al. (2014). Stimulation of Somatic Cell Reprogramming by ERas-Akt-FoxO1 Signaling Axis. *Stem Cells* 32, 349–363.

Zhang, X., Cruz, F.D., Terry, M., Remotti, F., and Matushansky, I. (2013). Terminal differentiation and loss of tumorigenicity of human cancers via pluripotency-based reprogramming. *Oncogene* 32, 2249–2260, 2260-21.

Zhang, X.-F., Settleman, J., Kyriakis, J., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S.J., Marshall, M.S., Bruder, J.T., Rapp, U.R., and Avruch, J. (1993). Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-

terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* 364, 308–313.

Zilfou, J.T., and Lowe, S.W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1, a001883.

