



**XLV LECCIÓN CONMEMORATIVA
JIMÉNEZ DÍAZ**

Madrid, 21 Mayo 2013

**“Nuevas fronteras
en la reprogramación celular”**

**Dr. Manuel Serrano
CNIO**

Se está empezando a entender la plasticidad celular y a manipularla de manera controlada. Este nuevo campo de investigación puede suponer una revolución para la medicina celular regenerativa. Aquí repasamos nuestras contribuciones más importantes a la relación entre reprogramación y cáncer, y discuto posibles futuras aplicaciones médicas de la reprogramación celular.

Hace tan sólo 6 años, Shinya Yamanaka sorprendió a la comunidad científica al descubrir que era posible convertir cualquier tipo celular diferenciado en células madre embrionarias (Takahashi and Yamanaka, 2006) (Figura 1). De un plumazo se eliminaron todas las barreras técnicas y éticas que habían frenado la investigación sobre este tipo de células humanas, y a la vez comenzó un campo de investigación fascinante sobre la plasticidad de las células.

Hoy día es posible convertir células de piel (por ejemplo, fibroblastos de la endodermis que suelen ser las células más usadas por su fácil acceso y cultivo) en tipos celulares tan diversos como neuronas, hepatocitos o cardiomiocitos, y esto puede hacerse directamente, sin pasar por el estado de célula madre embrionaria, es lo que se llama “reprogramación directa” (Ladewig et al., 2013) (Figura 1). Sin embargo, la “reprogramación embrionaria” original de Yamanaka sigue siendo el método más prometedor para una futura medicina celular regenerativa debido a que las células madre embrionarias se multiplican con enorme rapidez y facilidad y mantienen intactas sus propiedades y su integridad genética, algo que no pasa con los tipos celulares adultos que no crecen con la misma rapidez y que tienen tendencia a acumular alteraciones genéticas.

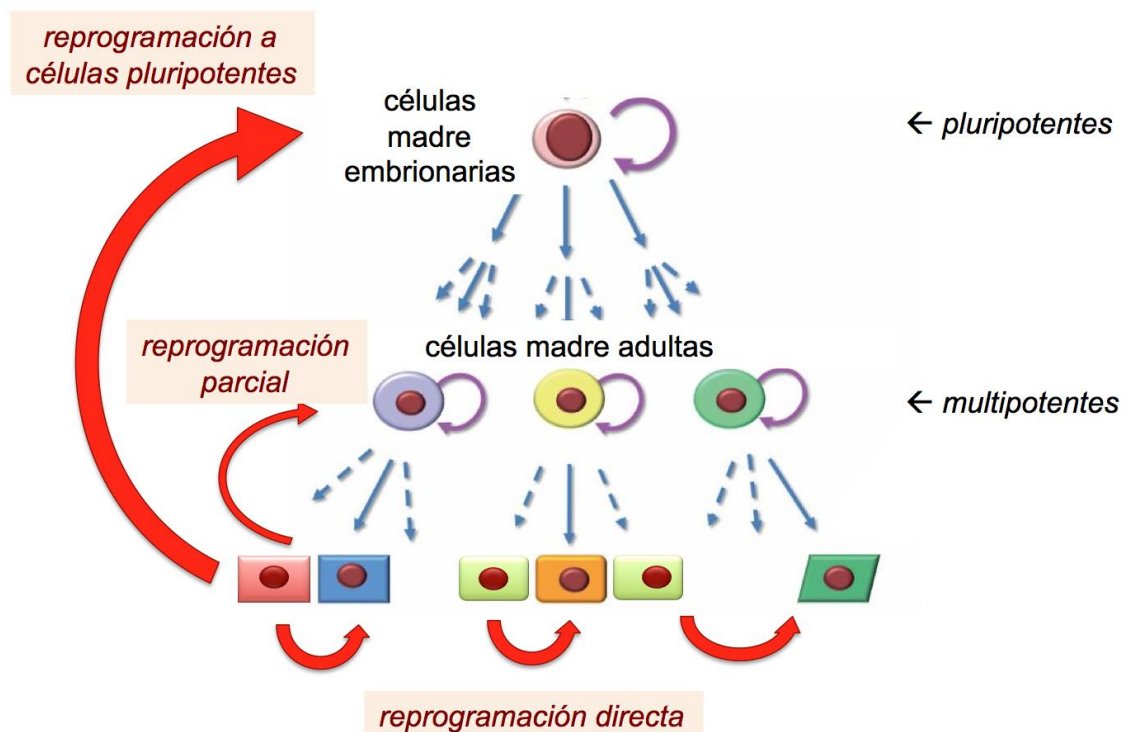


Figura 1. Esquema de la jerarquía entre células madre embrionarias, células madre adultas y células diferenciadas. Se indican con flechas rojas las distintas reprogramaciones que se mencionan en el texto.

Nuestras contribuciones a la conexión entre reprogramación y cáncer

El proceso de reprogramación puede también ser informativo en el estudio del cáncer. Estudios recientes han demostrado que los carcinomas humanos pueden separarse en dos clases, atendiendo a la expresión o no de la llamada “firma de célula troncal embrionaria” característica de las células ES e iPS (Ben-Porath et al., 2008; Wong et al., 2008). En gran medida, estos carcinomas con “firma embrionaria” corresponden a los carcinomas más malignos, y su presencia en tumores se relaciona con mal pronóstico. Estas observaciones podrían sugerir que la mayoría de los tumores malignos humanos han desarrollado una reprogramación aberrante. Además, se ha observado que la “firma embrionaria” se asocia con un aumento en la capacidad de iniciar un tumor de las células cancerosas (una propiedad que ha sido asociada a las hipotéticas “células madre del cáncer”. Recientemente se ha propuesto que los factores de reprogramación podrían conferir plasticidad a las células tumorales, lo cual las hace más adaptables a las condiciones cambiantes que pueden darse dentro de un tumor (Suva et al., 2013).

Nuestro laboratorio ha demostrado recientemente que existe una relación entre los supresores tumorales y la reprogramación celular. El locus *Ink4a/Arf* (que codifica para los supresores de tumores p16^{INK4a} y p19^{ARF}) se reprime durante la reprogramación y el silenciamiento de este locus es un paso limitante para el proceso de reprogramación celular (Li et al., 2009). Por otro lado, en colaboración con el grupo de María Blasco hemos descrito que el supresor de tumores p53 es un regulador negativo clave en el proceso de reprogramación e impide la reprogramación de células con daño en el DNA (Marion et al., 2009). Estas observaciones indican que la carcinogénesis y la reprogramación celular están controladas por vías de supresión tumoral comunes, reforzando la relación entre ambos procesos.

Por otro lado, hemos descubierto una relación inesperada entre el supresor de tumores p27^{KIP1} y la reprogramación. En particular, hemos visto que p27^{KIP1} contribuye a la represión transcripcional del factor de reprogramación *Sox2*. Siguiendo con la relación entre reprogramación y cáncer, los ratones deficientes en *p27KIP1* desarrollan tumores de pituitaria y esto está asociado a una mayor expresión de *Sox2*. Si combinamos la deficiencia de *p27KIP1* con una deficiencia parcial (heterozigosis) de *Sox2* se eliminan en gran medida los tumores de pituitaria. Estas observaciones apoyan una relación causal entre la falta de *p27KIP1*, el aumento de *Sox2* y los tumores de pituitaria.

En las siguientes líneas repaso algunos de los temas pendientes que concentran gran parte de la investigación en el campo de la “reprogramación embrionaria” y que afectan en igual medida a la “reprogramación directa”.

Reprogramación química. Una limitación muy importante de la reprogramación celular, tanto la embrionaria como la directa, es el hecho de que requiere introducir genes exógenos en las células parentales. Estos genes son en su mayoría factores de transcripción y muchos de ellos tienen propiedades oncogénicas. Además, estos factores sólo se pueden introducir de manera eficiente y poco inmunogénica usando vectores de tipo retroviral que tienen la propiedad de integrarse al azar en el genoma y esto se sabe que conlleva un riesgo de producir lesiones oncogénicas. Por estos motivos hay un enorme interés en conseguir la reprogramación usando exclusivamente suplementos en los medios de cultivo, tanto péptidos activos como factores de crecimiento o citoquinas, como compuestos químicos que imiten la función de los factores de reprogramación

genéticos (Li et al., 2012). Se ha avanzado mucho en esta dirección. Por ejemplo, algunos de los factores originales de Yamanaka se han podido sustituir por compuesto químicos, se han descubierto otros compuestos químicos que potencian la reprogramación, pero aún no se ha conseguido la “reprogramación embrionaria” completa sin usar factores genéticos.

Reprogramación por pasos. Hasta ahora sólo es posible la “reprogramación embrionaria” cuando se introducen simultáneamente todos los factores genéticos (generalmente cuatro). Sin embargo hay muchas sospechas de que la reprogramación no ocurre en un solo paso (Polo et al., 2012). De hecho, la reprogramación suele implicar un plazo de tiempo extrañamente dilatado, normalmente 2 semanas. Qué pasa durante todo este tiempo es algo que se está empezando a diseccionar pero que todavía es muy oscuro. Uno de los grandes objetivos es conseguir una reprogramación por etapas, con sucesivas paradas en estados intermedios estables, pero ésto aún no se ha conseguido. El deconstruir la reprogramación en etapas permitiría analizar separadamente cada etapa y optimizarla.

Reprogramación eficiente. La baja eficiencia del proceso de reprogramación es una dificultad añadida para la caracterización bioquímica del proceso de reprogramación. Las eficiencias más altas de reprogramación conseguidas están en el orden del 10% (es decir, una de cada diez células tratadas alcanzan el estado de célula madre embrionaria, mientras que el resto son procesos abortivos que terminan en apoptosis o senescencia celular). Nosotros hemos contribuido a este problema identificando a los genes supresores de tumores p16INK4a, p19ARF y p53 como barreras importantes para la reprogramación (Li et al., 2009; Marion et al., 2009). Estos genes se pueden silenciar transitoria y reversiblemente y de este modo conseguir eficiencias del 10% sin por ello perder la funcionalidad posterior de estos genes supresores.

Reprogramación intermedia. Las células madre embrionarias, a pesar de sus ventajas, como crecer rápida y establemente, presentan algunas limitaciones. Una de ellas es la dificultad, todavía no resuelta, de diferenciarlas in vitro de manera controlada y homogénea (es decir, conseguir diferenciaciones de todas las células parentales y únicamente en el tipo celular deseado). Una solución a este problema podría ser el renunciar a la reprogramación embrionaria y conformarse con reprogramaciones parciales o intermedias que hipotéticamente podrían ser ventajosas. Estos estadios intermedios no están bien caracterizados ni son estables, pero sí que hay evidencias experimentales de que una exposición transitoria de las células parentales a los factores de reprogramación las convierte por un tiempo en un estado “plástico” desde el cual es posible dirigir su diferenciación de manera más eficiente (Kurian et al., 2013) (Figura 1). Como quizás se pueda intuir por lo anterior, una gran pregunta aún sin resolver es si la reprogramación embrionaria recapitula “marcha atrás” los procesos de diferenciación, o si por el contrario es un camino totalmente independiente que lleva al punto de partida embrionario por un “atajo”.

Reprogramación y cáncer. Finalmente, aún hay muchas preguntas pendientes sobre qué papel juega la reprogramación celular en el cáncer (Suva et al., 2013). Hay dos visiones no necesariamente en conflicto sobre este punto. Según una de ellas, el cáncer implica un proceso aberrante e incompleto de reprogramación (reprogramación oncogénica). Según otra visión, inducir la reprogramación en células cancerosas puede permitir a la célula tumoral reconducirse por un proceso de diferenciación que

cancelaría el fenotipo tumorigénico (reprogramación anti-oncogénica). Todavía se sabe demasiado poco como para aventurar si alguna de estas posibilidades será relevante.

Referencias

- Ben-Porath, I., Thomson, M.W., Carey, V.J., Ge, R., Bell, G.W., 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.
- Kurian, L., Sancho-Martinez, I., Nivet, E., Aguirre, A., Moon, K., Pendaries, C., Volle-Challier, C., Bono, F., Herbert, J.M., Pulecio, J., et al. (2013). Conversion of human fibroblasts to angioblast-like progenitor cells. *Nat Methods* *10*, 77-83.
- Ladewig, J., Koch, P., and Brustle, O. (2013). Leveling Waddington: the emergence of direct programming and the loss of cell fate hierarchies. *Nat Rev Mol Cell Biol* *14*, 225-236.
- Li, H., Collado, M., Villasante, A., Strati, K., Ortega, S., Canamero, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2009). The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* *460*, 1136-1139.
- Li, W., Jiang, K., and Ding, S. (2012). Concise review: A chemical approach to control cell fate and function. *Stem Cells* *30*, 61-68.
- Marion, 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.
- 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.
- Suva, M.L., Riggi, N., and Bernstein, B.E. (2013). Epigenetic reprogramming in cancer. *Science* *339*, 1567-1570.
- 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.
- Wong, D.J., Liu, H., Ridky, T.W., Cassarino, D., Segal, E., and Chang, H.Y. (2008). Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells. *Cell Stem Cell* *2*, 333-344.