



ESCUELA DE DOCTORADO
INTERNACIONAL DE LA USC

Pablo
Pedrosa Lado

Tesis doctoral

Reprogramación celular como
herramienta para el estudio del
cáncer

Santiago de Compostela, 2022

Programa de doctorado en Medicina Molecular



TESIS DE DOCTORADO

**REPROGRAMACIÓN CELULAR
COMO HERRAMIENTA PARA
EL ESTUDIO DEL CÁNCER**

Pablo Pedrosa Lado

ESCUELA DE DOCTORADO INTERNACIONAL DE LA UNIVERSIDAD DE
SANTIAGO DE COMPOSTELA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN MEDICINA MOLECULAR

SANTIAGO DE COMPOSTELA
AÑO 2021



D./Dña. **Pablo Pedrosa Lado**

Título de la **Reprogramación celular como herramienta para el**
tesis: **estudio del cáncer**

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) De ser el caso, en la tesis se hace referencia a las colaboraciones que tuvo este trabajo.
- 3) 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.
- 4) La tesis es la versión definitiva presentada para su defensa y coincide la versión impresa con la presentada en formato electrónico.

Y me comprometo a presentar el Compromiso Documental de Supervisión en el caso que el original no esté depositado en la Escuela.

En Santiago de Compostela, 21 de diciembre de 2021.

Firma electrónica

D./Dña. **Anxo Vidal Figueroa y Manuel Collado Rodríguez**

En condición
de: **Tutor/a y director/a**

Título de la
tesis: **Reprogramación celular como herramienta para el estudio del cáncer**

INFORMA:

Que la presente tesis, se corresponde con el trabajo realizado por D/Dña Pablo Pedrosa Lado, bajo mi dirección/tutorización, y autorizo su presentación, considerando que reúne los requisitos exigidos en el Reglamento de Estudios de Doctorado de la USC, y que como director/tutor de esta no incurre en las causas de abstención establecidas en la Ley 40/2015.

En Santiago de Compostela, 21 de diciembre de 2021

Firma electrónica

Pablo Pedrosa Lado, autor de la presente tesis, declaro que no existe ningún conflicto de interés.

Bueno, llega el momento de escribir los agradecimientos, esa parte de la tesis que va al principio pero que se escribe al final. Han sido varios años de trabajo en los que además de progresar a nivel profesional, también he realizado grandes progresos a nivel personal. En este apartado me gustaría agradecer a todas las personas que me han ayudado a recorrer este camino y a avanzar.

En primer lugar, agradecer a Manuel la oportunidad de hacer el TFM primero y la tesis después. Aunque como en todo, haya momentos mejores y otros peores, ha sido un auténtico placer trabajar juntos durante estos años.

Agradecer también a Anxo y a Mela, así como a todos los miembros de sus respectivos grupos, la ayuda y la predisposición mostrada durante todos estos años.

Por supuesto, también agradecer a todos mis compañeros del laboratorio 13. Es difícil imaginar como un lugar tan pequeño puede dar para generar tantos recuerdos, sabéis que soy una persona parca en palabras, pero vamos a ello. En primer darle las gracias a Jessi y a Alba, ambas fuisteis un apoyo fundamental durante mi comienzo en el labo, muchas gracias por enseñarme tantas cosas y por la paciencia mostrada durante esa etapa. Agradecer también a todos los compañeros más recientes, que han sido un apoyo muy importante y han generado un ambiente perfecto para trabajar: Francisco (echo de menos esas pachangas y las cañitas contigo tío), Marta Magariños, Aida, Patri, Lucía, Víctor y Valen (calviiiito, me temo que a ti no te voy a echar de menos jaja), sois grandes personas, os merecéis lo mejor y estoy seguro de que os irá muy bien. Agradecer también a todas las personas (que son muchas) que han pasado por el labo: Sonia, Sabela Quirós, Mousa, Lucía, Cris, Laura, Fernanda, Paula, María, Mónica, Natalia, Marga... y como no a las madrileñas adoptadas, Sandra y Nuria, esa estancia se nos hizo muy corta a todos! Por último, darle las gracias a las personas con las que más tiempo he compartido el laboratorio: Pili y Sabela. Sabela, has sido la persona de la que más he aprendido durante estos años, muchas gracias por enseñarme a ver las cosas desde una

perspectiva distinta a la que estoy acostumbrado, durante estos años te has ganado mi respeto y mi cariño. Pili, tú has sido sin duda la persona que más me ha tenido que aguantar durante esta etapa, muchas gracias por tu comprensión, tu apoyo y tu ayuda en todo momento.

Agradecer también a todos los compañeros del IDIS (Eloi, Adri, Andrea, Manu...) y a todas las personas con las que he podido trabajar durante estos años (Daniel Muñoz, Ramón, Sabela Casado, Nerea, Tamara...) muchas gracias a todos y todas.

Darles las gracias a mis amigos de toda la vida: Jesús, Juan, Sergio, Fer, Gabri, Irene, María, Fonso, Chindo, Ana y a las recientes incorporaciones (Daniela y Bran), muchas gracias por sacarme una sonrisa, por ser una vía de escape muy necesaria y escucharme hablar del trabajo (aunque no entendáis la mitad de lo que digo jaja) y en general por estar ahí siempre que os necesito, sois un gran apoyo y una parte muy importante de mi vida. También a mis amigos de la carrera (y compañeros de vicio jeje): David, Isma, Sabe y Luís. que podamos seguir reuniéndonos y disfrutando juntos por mucho tiempo. Pero sobre todo quiero darle las gracias a Isa, has sido un apoyo fundamental desde que llegaste a mi vida tanto personal como profesionalmente: durante la carrera, el máster y la tesis, has hecho que recorrer este camino haya sido mucho más fácil y agradable (está comprobado científicamente jaja) y quizás sin ti llegar a este punto no habría sido posible, por lo que este trabajo en buena parte también es gracias a ti.

Finalmente, darle las gracias a esas personas que han permanecido a mi lado de forma incondicional y que me demuestran su cariño día a día, mi familia. Esta tesis va por vosotros: por mi hermana Lidia, mi sobrina Paula y mi cuñado David, pero sobre todo, por la persona más importante que hay en mi vida, mi madre. Muchas gracias mamá, todo lo bueno que pueda llegar conseguir es gracias a ti, al cariño, al apoyo constante, a los valores y la educación que me has enseñado, esas cosas, las realmente importantes, no se aprenden en la escuela ni se compran con dinero.

La reprogramación celular es el proceso por el que una célula somática diferenciada adquiere características de célula madre embrionaria, convirtiéndose en una célula pluripotente con capacidad para formar células de las tres capas embrionarias. El desarrollo de una estrategia de reprogramación basada en el uso de factores definidos ha supuesto una revolución en el campo de la reprogramación celular, aumentando considerablemente el número de tipos celulares que se han logrado reprogramar con éxito. Sin embargo, la reprogramación de células tumorales sigue siendo un proceso poco eficiente.

En primer lugar, en este trabajo evaluamos las dificultades que presentan las células transformadas para ser reprogramadas. Además, observamos como durante el proceso de reprogramación estas células se ven afectadas negativamente, por lo que decidimos estudiar el efecto de la expresión de los factores de reprogramación en células transformadas tanto humanas como de ratón. Observamos que la expresión de los factores de reprogramación reduce la viabilidad de las células transformadas y activa los procesos de apoptosis y senescencia celular, acompañados por un aumento de daño en el ADN. También analizamos la contribución individual de cada uno de los factores de reprogramación a los efectos observados; vemos que los factores *Oct4* y *Klf4* parecen ser los responsables principales de la reducción en la viabilidad celular. Además, evaluamos el papel de p21 en la respuesta celular a la expresión de los factores, tanto conjunta como individual, demostrando que esta proteína juega un papel central como mediador en la activación de los procesos de senescencia y apoptosis observados durante la expresión de los factores de reprogramación.

Finalmente, también estudiamos el efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre la progresión tumoral *in vivo*. Para ello utilizamos diferentes modelos y en todos ellos observamos cómo la expresión de los factores de reprogramación reduce el crecimiento tumoral y activa procesos de apoptosis celular.

En conjunto, esta tesis demuestra que la expresión de los factores de reprogramación reduce la viabilidad y la capacidad proliferativa de las células tumorales tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* y describe los mecanismos moleculares activados en estas células en respuesta a la expresión de los factores de reprogramación.

A reprogramación celular é o proceso polo cal unha célula somática diferenciada adquire as características dunha célula nai embrionaria, converténdose nunha célula pluripotente con capacidade para formar células das tres capas embrionarias. O desenvolvemento dunha estratexia de reprogramación baseada no uso dunha serie de factores definidos provocou unha revolución no campo da reprogramación celular, aumentando considerablemente o número de tipos celulares que foron reprogramados con éxito. Non obstante, a reprogramación das células tumorais segue sendo un proceso ineficiente.

En primeiro lugar, neste traballo avaliamos as dificultades que presentan as células transformadas para ser reprogramadas. Ademais, observamos como estas células son afectadas negativamente durante o proceso de reprogramación, polo que decidimos estudar o efecto da expresión dos factores de reprogramación en células transformadas tanto humanas como de rato. Observamos que a expresión dos factores de reprogramación reduce a viabilidade das células transformadas e activa os procesos de apoptose e senescencia celular, acompañado dun aumento do dano no ADN. Tamén se analiza a contribución individual de cada un dos factores de reprogramación aos efectos observados; vemos que os factores *Oct4* e *Klf4* parecen ser os principais responsables da redución da viabilidade celular. Ademais, avaliouse o papel de p21 na resposta celular á expresión dos factores, tanto conxunta como individualmente, mostrando que esta proteína xoga un papel central como mediadora na activación dos procesos de senescencia e apoptose observados durante a expresión dos factores de reprogramación.

Finalmente, tamén estudamos o efecto da expresión dos factores de reprogramación na progresión tumoral *in vivo*. Para iso utilizamos diferentes modelos, observando como a expresión dos factores de reprogramación reduce o crecemento tumoral e activa procesos de apoptose celular.

No seu conxunto, esta tese mostra que a expresión dos factores de reprogramación reduce a viabilidade e a capacidade proliferativa das células tumorais tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo* e describe os mecanismos moleculares que se activan nestas células en resposta á expresión dos factores de reprogramación.

Cell reprogramming is the process by which differentiated somatic cell acquires characteristics of an embryonic stem cell, becoming a pluripotent cell with the capacity to form cells of the three embryonic layers. The development of a reprogramming strategy based on the use of defined factors has been a great advance in this field, considerably increasing the number of cell types that have been successfully reprogrammed. However, tumor cell reprogramming remains an inefficient process.

First, we evaluate the difficulties that transformed cells presents during reprogrammed. Furthermore, we observed how these cells are negatively affected during the reprogramming process, so we decided to study the effect of the expression of reprogramming factors in transformed human and mouse cells. We observed that the expression of reprogramming factors reduces the viability of transformed cells and activates the processes of apoptosis and cellular senescence, accompanied by an increase in DNA damage. We also analyze the individual contribution of each reprogramming factor to the observed effects; we see that *Oct4* and *Klf4* seems to be the main responsables in the reduction of cell viability. In addition, we evaluated the role of p21 in the cellular response to the expression of factors, both joint and individual, showing that this protein plays a central role as a mediator in the activation of the senescence and apoptosis processes observed during the expression of reprogramming factors.

Finally, we also study the effect of the expression of reprogramming factors on tumor progression *in vivo*. For this we use different models and in all of them we observe how the expression of reprogramming factors reduces tumor growth and activates processes of cell apoptosis.

The thesis shows that the expression of reprogramming factors reduces the viability and proliferative capacity of tumor cells both *in vitro* and *in vivo* systems and describes the molecular mechanisms activated in these cells in response to the expression of reprogramming factors.

ABREVIATURAS.....	1
INTRODUCCIÓN.....	5
1. Reprogramación celular.....	7
1.1. Células madre: pluripotencia y diferenciación	7
1.2. Primeras estrategias de reprogramación celular	9
1.3. Reprogramación celular por factores definidos.....	11
1.4. Reprogramación <i>in vivo</i>	13
1.5. Aplicaciones y futuro de la reprogramación celular	14
2. Cáncer	15
2.1. Características moleculares del cáncer	15
2.2. Oncogenes: proteínas de la familia ras	17
2.2.1. Principales efectores y funciones de las proteínas Ras..	18
2.2.2. Ras en cáncer y como modelo para el estudio del cáncer.	19
2.3. Supresores de tumores	20
2.3.1. Proteínas <i>pocket</i> de la familia de retinoblastoma.	21
2.3.2. Inhibidores de Cdks.....	22
2.3.2.1. Familia INK4	22
2.3.2.2. Familia Cip/Kip	22
2.3.3. p53.....	24
3. Reprogramación celular y cáncer	25
3.1. Características fenotípicas comunes	25
3.2. Mecanismos comunes	25
3.2.1. Factores de reprogramación.....	25
3.2.2. Cambios epigenéticos	27
3.2.3. Supresores tumorales y oncogenes.....	28
3.3. Reprogramación de células tumorales	30

4. Ciclo celular, senescencia y apoptosis	33
4.1. Regulación del ciclo celular y carcinogénesis.....	33
4.2. Senescencia.....	35
4.2.1. Causas y funciones de la senescencia celular	35
4.2.2. Características y marcadores de células senescentes	38
4.2.2.1. Cambios morfológicos	39
4.2.2.2. Actividad de la enzima beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA-beta-Gal)	39
4.2.2.3. Resistencia a la apoptosis.....	40
4.2.2.4. Fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP) ..	40
4.2.3. Senescencia y reprogramación celular	41
4.3. Apoptosis	43
4.3.1. Causas y funciones de la apoptosis	43
4.3.2. Principales vías implicadas en la apoptosis	44
4.3.3. Apoptosis y reprogramación celular	46
OBJETIVOS	49
MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
1. Animales de experimentación	55
1.1. Condiciones de estabulación	55
1.2. Ratón NMRI-Foxn1 ^{nu/un}	55
1.3. Ratón reprogramable i4F	55
1.4. Ratón KrasV12-KI	56
2. Protocolos de experimentación animal	56
2.1. Tratamiento con doxiciclina en agua de bebida	56
2.2. Inyección subcutánea de células A549	56
2.3. Inyección en vena lateral de cola de células Cml57	57
2.4. Administración intratraqueal de Ad-CRE.....	57

2.5. Medida de la progresión tumoral por IVIS	57
3. Cultivos celulares	58
3.1. Cultivo primario de MEFs <i>wt</i> y MEFs <i>p53-null</i>	58
3.2. Líneas celulares	59
3.3. Preparación de <i>feeders</i>	59
3.4. Tratamientos celulares	60
3.4.1. Doxiciclina.....	60
3.4.2. Doxorubicina.....	60
3.4.3. Inhibidor de caspasas	60
4. Vectores plasmídicos.....	61
4.1. Microorganismos empleados	61
4.2. Medios de cultivo de bacterias	61
4.2.1. Medio líquido	61
4.2.2. Medio sólido	61
4.3. Obtención del ADN plasmídico	61
4.4. Plásmidos utilizados.....	62
5. Transducción retroviral y lentiviral.....	63
5.1. Transfección celular	63
5.2. Transducción celular.....	63
6. Análisis de la expresión de ARN	64
6.1. Extracción de ARN	64
6.2. Retrotranscripción de ARN	64
6.3. qRT-PCR	65
7. Análisis de la expresión proteica.....	66
7.1. Extracción de proteínas.....	66
7.2. Cuantificación de proteínas	66
7.3. Western blot.....	67

8. Reprogramación celular	69
8.1. Reprogramación con vectores lentivirales	69
8.2. Tinción fosfatasa alcalina (AP)	69
9. Ensayos de proliferación celular	70
9.1. Proliferación a tiempos cortos	70
9.2. Ensayos de proliferación con el <i>XCELLigence</i>	70
9.3. Ensayos de clonogenicidad.....	70
9.3.1. Tinción cristal violeta.....	70
9.4. Ensayo de formación de colonias en agar blando	71
10. Detección de la actividad SA-beta-Gal	71
10.1. Tinción histoquímica SA-beta-Gal	71
10.2. Galactón	72
10.3. Detección de la actividad SA-beta-Gal por FACS.....	72
11. Detección de marcadores de apoptosis	73
11.1. Anexina V por FACS.....	73
11.2. Caspasa 3 cortada por FACS	73
11.3. Caspasa 3 cortada por sonda fluorescente	74
12. Análisis de la composición de ciclo celular	74
13. Ensayo con factores secretados	75
13.1. Ensayos en <i>transwell</i>	75
13.2. Ensayos con medios condicionados.....	75
15. Análisis histológico	75
15.1. Inclusión en parafina.....	75
15.2. Hematoxilina-eosina (H&E).....	76
15.3. Tinción inmunohistoquímica de Oct4 y Caspasa 3 cortada.	76
16. Microscopía	77

17. Análisis estadístico	77
RESULTADOS.....	79
1. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación en células transformadas	81
1.1. Reprogramación celular de células transformadas	81
1.2. Células de ratón	82
1.2.1. Sistema de transformación celular en MEFs	83
1.2.2. Efecto de la expresión de los factores sobre la capacidad proliferativa en MEFs transformados	84
1.3. Células humanas	85
1.3.1. Efecto de la expresión combinada de los factores de reprogramación sobre la capacidad proliferativa	86
1.3.2. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre colonias celulares ya establecidas.....	89
1.3.3. Mecanismos moleculares activados por la expresión de los factores de reprogramación en células A549	90
1.3.3.1. Marcadores de apoptosis celular	90
1.3.3.1.1. Tratamiento con inhibidores de apoptosis celular en células A549 que expresan los factores de reprogramación.....	91
1.3.3.2. Marcadores de senescencia celular.....	93
1.3.3.3. Marcadores de daño al ADN	95
1.3.3.4. Perfil de ciclo celular.....	96
1.3.4. Efecto de los factores solubles secretados por células A549 que expresan los factores de reprogramación	97
1.3.5. Efecto de la inhibición de p21 en células A549 que expresan conjuntamente los factores de reprogramación.....	98
1.3.5.1. Sistema de inhibición de p21 en A549.....	100

1.3.5.2. Efecto sobre la capacidad proliferativa	100
1.3.5.3. Marcadores de apoptosis celular	101
1.3.5.4. Marcadores de senescencia celular.....	103
1.3.6. Efecto de la expresión individual de los factores de reprogramación sobre A549 utilizando vectores retrovirales	103
1.3.7. Efecto dosis-dependiente de la expresión de los factores de reprogramación en células A549	105
1.3.8. Efecto de la expresión individual de los factores de reprogramación sobre A549 utilizando vectores lentivirales.	106
1.3.8.1. Efecto sobre la capacidad proliferativa	107
1.3.8.2. Marcadores de apoptosis celular	109
1.3.8.3. Marcadores de senescencia celular.....	110
1.3.9. Efecto de la inhibición de p21 en células A549 que expresan individualmente los factores de reprogramación	111
1.3.9.1. Efecto sobre la capacidad proliferativa	113
1.3.9.2. Marcadores de apoptosis celular	114
1.3.9.3. Marcadores de senescencia celular.....	115
2. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre la progresión tumoral.....	117
2.1. Ensayos de desarrollo tumoral por inyección subcutánea de células A549 que expresan o no los factores de reprogramación en Ratones NMRI- <i>Foxn1</i> ^{nu/nu}	117
2.2. Ensayos de formación tumoral por inyección en vena de cola de células Cml75 que expresan o no los factores de reprogramación en ratones C57BL/6	119
2.3. Ensayos de progresión tumoral sobre tumores pulmonares ya establecidos en ratones i4F/Kras	121
DISCUSIÓN	125

1. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación en células transformadas.....	127
1.1. Reprogramación de células transformadas	127
1.2. Caracterizar el efecto de la expresión de los factores de reprogramación en células transformadas.....	128
1.3. Caracterizar el efecto de la expresión individual de los factores de reprogramación en células transformadas.....	133
2. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación celular sobre la progresión tumoral <i>in vivo</i>	136
CONCLUSIONES.....	141
BIBLIOGRAFÍA	145

ABREVIATURAS

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN complementario
AP: *Alkaline phosphatase*
APAF1: *Apoptotic Protease Activating Factor-1*
APS: *Ammonium persulfate*
ARN: Ácido ribonucleico
ARNm: ARN mensajero
BCL-2: *B-Cell Lymphoma-2*
BrdU: *5-bromo.2'-deoxyuridine*
BSA: *Bovine Serum Albumin*
Cdk: *Cyclin Dependent Kinases*
CDKis: *Cyclin-dependent kinases inhibitors*
CDKN1A: *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*
CEBP/ α : *CCAAT Enhancer Binding Protein Alpha*
c-Myc: *Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*
CRISPR: *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*
DDR: *DNA Damage Response*
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
DMSO: *Dimethyl Sulfoxide*
Doxi: Doxiciclina
Doxo: Doxorubicina
ECL: *Enhanced Chemiluminescence*
EdU: *5-ethynyl-2'-deoxyuridine*
Erk1/2: *Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2*
ESC: *Embryonic Stem Cells*
E2F: *E2 factor*
FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting*
FADD: *Fas-Associated Death Domain Protein*
FBS: *Fetal Bovine Serum*
Foxn1: *Forkhead box N1*
GAP: *GTPase-Activating Protein*
GAPDH: *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*
GDP: *Guanosine Diphosphate*

GFP: *Green Fluorescent Protein*
GTP: *Guanosine Triphosphate*
H&E: *Hematoxilina y Eosina*
HEK293T: *Human Embryonic Kidney 293T*
HP1: *Heterochromatic Protein 1*
HRP: *Horseradish Peroxidase*
H2AX: *H2A Histone family member X*
H3: *Histone H3*
Il6: *Interleukin 6*
Ink4: *Inhibitors of CDK4*
iPSC: *Induced Pluripotent Stem Cell*
i4F: *Inducible four Factor*
Klf4: *Krüppel-like factor 4*
KO: *Knock-out*
KSR: *Knock-out Serum Replacement*
LB: *Luria-Broth*
LIF: *Leukemia Inhibitory Factor*
MAPK: *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MEFs: *Mouse Embryonic Fibroblasts*
Mek: *MAP kinase kinase*
mTOR: *Mammalian Target Of Rapamycin*
NT: *Natural killers*
Oct4: *Octamer-binding Transcription factor 4*
OIS: *Oncogene Induced Senescence*
PBS: *Phosphate Buffered Saline*
PCNA: *Proliferating Cell Nuclear Antigen*
PCR: *Polymerase Chain Reaction*
PDAC: *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*
PEI: *Polietilenimina*
p21: *Cdk inhibitor CIP1*
p53: *Cellular tumor antigen p53*
qRT-PCR: *Quantitative Real Time PCR*
RalGDS: *Ral guanine nucleotide dissociation stimulator*
Ras: *Rat sarcoma*
Ras-GAPs: *Ras-GTPase Activating Proteins*
Ras-GEFs: *Ras-Guanine nucleotide Exchange Factor*

RB: *Retinoblastoma*
RIPA: *Radio-Immune Precipitation Assay*
RIS: *Reprogramming Induced Senescence*
RT: *Room Temperature*
rtTA: *Reverse Tetracycline-controlled Transactivator*
SA-beta-Gal: *Senescence Associated beta-galactosidase*
SAHF: *Senescence-Associated Heterochromatin Foci*
SASP: *Senescence Associated Secretory Phenotype*
SCNT: *Somatic Cell Nuclear Transfer*
SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*
shp21: *Short Hairpin RNA contra p21*
Sox2: *Sex determining region Y-box 2*
SPF: *Specific Pathogen Free*
SSEA1: *Stage-Specific Embryonic Antigen 1*
TetOP: *Tetracycline-Controlled Promoter*
TNF α : *Tumour Necrosis Factor α*
wt: *Wild type*
X-Gal: *5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside*
53BP1: *p53 Binding Protein 1*

INTRODUCCIÓN

1. Reprogramación celular

1.1. CÉLULAS MADRE: PLURIPOTENCIA Y DIFERENCIACIÓN

Las células madre están presentes en todos los organismos multicelulares y se caracterizan por poder presentar divisiones asimétricas; por un lado, dan lugar a células madre idénticas a las progenitoras de las que derivan y por otro, pueden dar lugar a células que se diferenciarán en linajes concretos obteniendo funciones específicas que difieren de las células de las que derivan (Smith, 2001; Weissman et al., 2001). Las células madre presentan por lo tanto dos características fundamentales: la autorrenovación y la capacidad de diferenciación.

La autorrenovación es el proceso por el que una célula madre se divide generando células hijas con el mismo potencial de diferenciación que la célula de la que derivan. Esta característica es fundamental porque permite que se mantenga la población de células madre en los organismos adultos para asegurar la renovación de las células en los diferentes tejidos y también es determinante durante el desarrollo embrionario porque permite que las células madre aumenten su número contribuyendo en la formación de los diferentes tejidos y órganos (He et al., 2009).

Las células madre son células indiferenciadas con una gran capacidad para generar diferentes tipos celulares con funciones muy diversas; células intestinales, células nerviosas o células musculares, entre otras. El proceso por el que estas células indiferenciadas forman los diferentes tipos celulares se denomina diferenciación y se caracteriza por estar altamente regulado (Weissman et al., 2001).

Estas características de las células madre permiten que durante el desarrollo embrionario a partir de una única célula (el cigoto) se forme un organismo con más de 200 tipos celulares distintos. Sin embargo, dentro de las células madre no todas presentan la misma capacidad de diferenciación, existiendo diferentes niveles en función de los tipos celulares que puedan producir.

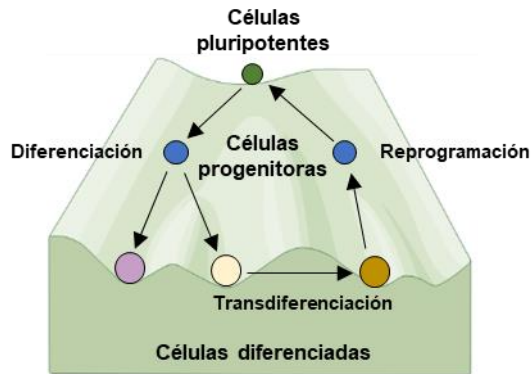


Figura 1. Imagen que ilustra la metáfora utilizada por Waddington. Se muestra el desarrollo celular normal (izquierda), en referencia al proceso de diferenciación celular que sufre una célula pluripotente (bola superior) para convertirse en una célula diferenciada (bola inferior) con una función tejido específica. También muestra el proceso de reprogramación celular (derecha), por el que una célula diferenciada se convierte en una célula pluripotente recorriendo el camino opuesto al anterior.

Durante el proceso de diferenciación, por el que se generan los diferentes tipos de células madre y de células somáticas, se modifica el patrón de expresión de diversos genes ajustándolo según el tipo celular que se pretenda obtener. Conrad Waddington representó este proceso utilizando una metáfora en la cual se representa a las células como canicas que ruedan por la ladera de una montaña con diferentes bifurcaciones que representan diferentes ajustes en los patrones de expresión génica, hasta alcanzar los lugares más bajos de la misma estabilizándose. Estos puntos representarían los diferentes tejidos que constituyen el organismo (Waddington C. H., 1957) (**Figura 1**).

En un principio se consideraba que este proceso de diferenciación era irreversible y que una vez alcanzado el estado de célula somática diferenciada esta identidad celular permanecería inalterable. Sin embargo, se han desarrollado diferentes estrategias (que trataremos en el siguiente apartado) que demuestran que las células diferenciadas conservan información suficiente como para revertir en mayor o menor medida las modificaciones realizadas durante el proceso de diferenciación. Por lo tanto, esta identidad celular se puede modificar, adquiriendo las células características diferentes a las que presentaban

en un principio. Este proceso se denomina plasticidad celular. Esta plasticidad permite producir cambios controlados en las células diferenciadas que modifican su identidad celular. Ejemplo de esto serían los procesos de transdiferenciación y reprogramación celular (**Figura 1**).

1.2. PRIMERAS ESTRATEGIAS DE REPROGRAMACIÓN CELULAR

La reprogramación celular se define como el proceso por el que una célula somática diferenciada adquiere características de célula madre embrionaria, convirtiéndose así en una célula pluripotente con capacidad para formar células de las tres capas embrionarias.

El primer ejemplo de reprogramación celular fue llevado a cabo por John Gurdon y para ello transfirió el núcleo de una célula somática a un oocito enucleado de *Xenopus*. Como resultado obtuvo un organismo completo y genéticamente idéntico al donante de la célula somática (Gurdon, 1962). Esto demuestra que el proceso de diferenciación no es irreversible y que, por lo tanto, las células no pierden información durante el mismo puesto que con esta estrategia se consiguió llegar hasta el estado totipotente. En el año 1997 Wilmut realizó ensayos similares utilizando células de mamífero y consiguió clonar a la oveja Dolly (Wilmut et al., 1997). En ambos casos la estrategia utilizada fue la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, *Somatic Cell Nuclear Transfer*), que consiste en la introducción del núcleo de una célula somática completamente diferenciada en un oocito no fertilizado y enucleado (**Figura 2**). Esta célula prolifera y forma un organismo que es genéticamente idéntico a la célula somática donante del núcleo, lo que es indicativo de que el citoplasma del oocito contiene factores que son determinantes para la inducción de la pluripotencia en la célula (Yamanaka & Blau, 2010).

Posteriormente se desarrolló otra estrategia de reprogramación basada en la fusión celular entre una célula somática y una célula madre pluripotente. Estos experimentos se realizaron tanto en células de ratón como en células humanas (Blau et al., 1983; Tada et al., 2001) (**Figura 2**). Con esta técnica se consiguió que células somáticas expresasen genes relacionados con la pluripotencia como Oct4 o Nanog y que se

diferencian en células de las tres capas embrionarias (Do & Schöler, 2004).

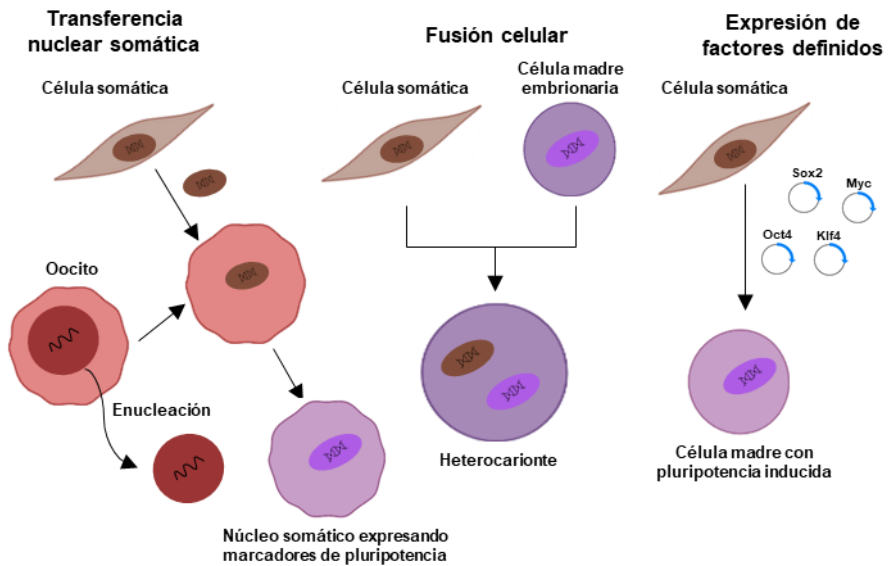


Figura 2. Estrategias de reprogramación celular. Representación esquemática de las estrategias de reprogramación celular: transferencia nuclear somática, fusión celular y expresión de factores definidos.

En conjunto estos experimentos demuestran que la información necesaria para alcanzar el estado pluripotente no se pierde durante el proceso de diferenciación y que existen factores que modulan la expresión de los genes responsables de la misma. Además, se conocen factores cuya expresión permite cambiar la identidad de una célula somática diferenciada directamente a otro tipo celular diferenciado. Este proceso se denomina transdiferenciación y se ha demostrado en varios ensayos, como por ejemplo en los realizados en mieloblastos en los que la sobreexpresión de GATA1 produce su conversión a megacariocitos (Kulesa et al., 1995) o los realizados con linfocitos B en los que la sobreexpresión de CEBP/ α los convierte en macrófagos (Xie et al., 2004). Del mismo modo, podrían existir factores específicos cuya expresión podría revertir el proceso de diferenciación y recuperar la pluripotencia.

1.3. REPROGRAMACIÓN CELULAR POR FACTORES DEFINIDOS

En el año 2006, Takahashi y Yamanaka desarrollan una nueva estrategia de reprogramación basada en el uso de una serie de factores definidos. Diseñan un sistema en el cual mediante la introducción de cuatro factores de transcripción, concretamente: Oct3/4 (*Octamer-binding transcription factor 3/4*), Klf4 (*Krüppel-like factor 4*), Sox2 (*SRY-box 2*) y c-Myc en cultivos celulares de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, *Mouse embryonic fibroblasts*) consiguen obtener células madre de pluripotencia inducida (iPSC, *induced pluripotent stem cell*) (Takahashi & Yamanaka, 2006) (**Figura 2**). Estudios posteriores demostraron que algunos de los factores pueden ser sustituidos por otros o incluso que es posible prescindir de alguno de ellos, como Myc, para la reprogramación de determinados tipos celulares (Nakagawa et al., 2008). Generalmente estos factores son denominados como OSKM o factores de Yamanaka.

La estrategia desarrollada por Takahashi y Yamanaka ha supuesto un avance importante en el campo de la reprogramación celular, provocando que muchos investigadores se interesen en este fenómeno. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que estos factores desencadenan la reprogramación no están del todo claros. La hipótesis que se plantea actualmente postula que este proceso se dividiría en dos etapas: una temprana y una tardía. La etapa temprana se caracterizaría por ser un evento estocástico y poco eficiente en el que los factores se unirían a multitud de genes. Entre estos, se encontrarían genes relacionados con la identidad somática de la célula y genes relacionados con la pluripotencia, de modo que los factores provocarían el silenciamiento de los primeros y la expresión de los segundos (Sridharan et al., 2009). La baja eficiencia de esta primera etapa se cree que puede ser debida a que muchos de los genes relacionados con la pluripotencia se encuentran en regiones del genoma con conformaciones de cromatina poco accesibles (Soufi et al., 2012). La etapa tardía se caracteriza por ser un evento más previsible y que se produciría de manera jerárquica, de modo que en esta segunda etapa los factores podrían acceder y promover la expresión de genes relacionados con el estado de pluripotencia estable, evento que no sería posible durante la primera etapa (Buganim et al., 2012). De esta forma, el

resultado de la etapa temprana conduce a la generación de células parcialmente reprogramadas que en este punto podrían entrar en la segunda etapa y culminar el proceso de reprogramación o revertir dicho proceso (Polo et al., 2012), este modelo explicaría la baja eficiencia del proceso de reprogramación.

En un principio, la introducción de estos factores se realizaba mediante el uso de vectores retrovirales para cada uno de los factores de forma individual (Takahashi & Yamanaka, 2006). Posteriormente se desarrollaron nuevas estrategias con el fin de mejorar la eficiencia del proceso. La más exitosa utiliza un único vector lentiviral que expresa los cuatro factores de reprogramación bajo el control de un único promotor e intercala péptidos 2A de *self-cleavage* entre cada uno de los factores. Esta estrategia utiliza un casete policistrónico incorporado en un vector de expresión del tipo FUW y bajo el control de un promotor dependiente de tetraciclina (**Figura 3**). Por lo tanto, la expresión de los factores puede inducirse utilizando análogos de la tetraciclina como la doxiciclina. De este modo, una vez introducido el vector en las células a reprogramar o utilizando líneas celulares que presenten esta construcción de forma estable, puede controlarse en qué momento se inicia la expresión de los factores y se desencadena el proceso de reprogramación mediante la adición de doxiciclina (Carey et al., 2009). Además de estas, se han desarrollado estrategias de reprogramación que no utilizan vectores integrativos con el fin de evitar el riesgo de mutaciones en las células receptoras, como: vectores episomales (C. Li et al., 2009), virus Sendai (Fusaki et al., 2009; Nishimura et al., 2011) o mRNAs sintéticos (Rosa & Brivanlou, 2010) e incluso remodelando la cromatina de los loci Oct4 y Sox2 endógenos utilizando la tecnología de repeticiones palindrómicas cortas, agrupadas y regularmente interespaciadas (CRISPR, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) (P. Liu et al., 2018).



Figura 3. Sistema de reprogramación lentiviral. Se muestra el vector lentiviral con los 4 factores (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc) separados por 3 péptidos 2A (T2A, E2A y P2A).

Desde su desarrollo, el proceso de reprogramación celular basado en el uso de factores definidos ha sido aplicado a una gran variedad de tipos celulares; desde fibroblastos (Takahashi & Yamanaka, 2006), Melanocitos (Utikal et al., 2009) o células B y T maduras (Eminli et al., 2009) de ratón, hasta hepatocitos (H. Liu et al., 2010) y células amnióticas (C. Li et al., 2009) humanas. Como resultado de este proceso de reprogramación se obtienen células madre de pluripotencia inducida que presentan varias características, entre las cuales cabe destacar: la expresión de genes propios de ESC, sobre todo marcadores relacionados con el estado pluripotente como Nanog o SSEA1 (*stage-specific embryonic antigen 1*), capacidad de autorrenovación, la producción de la proteína fosfatasa alcalina (una de las pruebas diagnósticas para evaluar si la reprogramación ha sido exitosa consiste en la detección de colonias positivas para esta actividad enzimática) o la capacidad de formar teratomas (caracterizados por presentar estructuras diferenciadas que pueden estar formadas por tipos celulares de cualquiera de las tres capas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo) cuando son inyectadas subcutáneamente en ratones inmunodeprimidos, lo que es indicativo de la capacidad de las iPSC para diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares (Martí et al., 2013). En definitiva, las iPSC resultantes van a presentar muchas características comunes con las ESC.

1.4. REPROGRAMACIÓN *IN VIVO*

La estrategia de reprogramación basada en el uso de factores definidos permitió la generación de modelos animales transgénicos que portan los factores de reprogramación integrados en su genoma.

En el año 2013 se reportó el primer caso exitoso de reprogramación celular *in vivo*. El modelo transgénico utilizado porta un casete policistrónico con los cuatro factores de reprogramación y además el transactivador dependiente de tetraciclina (rtTA, *Reverse tetracycline-controlled transactivator*) por lo que en presencia de tetraciclina o algún análogo, como la doxiciclina, se produce la expresión de los factores (Abad et al., 2013). En años posteriores se generaron modelos transgénicos muy similares (Ohnishi et al., 2014).

La activación de los factores de reprogramación produce la pérdida de marcadores de diferenciación, como las citoqueratinas y la adquisición de marcadores de pluripotencia, como *Nanog*, en muchos tejidos lo que desencadena procesos de dediferenciación y reprogramación que conllevan la formación de teratomas. Sin embargo, pese a que los factores se expresan en todos los tejidos la respuesta en los mismos es muy diferente y existen tejidos que se reprograman con más facilidad que otros, lo que nos indica que la plasticidad celular en los diferentes tejidos varía. Además de la presencia de teratomas, los investigadores lograron aislar iPSC de la sangre de estos ratones y observaron cómo el estado de dediferenciación es más potente que el obtenido en los experimentos *in vitro*, ya que estas células pueden generar estructuras propias de la placenta, lo que es indicativo de que se alcanza el estado totipotente (Abad et al., 2013).

Un aspecto importante de estos modelos transgénicos es que permiten regular la expresión de los factores en base a la presencia o no del activador, generalmente es doxiciclina mezclada con el agua de bebida. La expresión de pulsos cortos de los factores no permite la reprogramación completa y, por lo tanto, evita la aparición de teratomas, pero se ha demostrado que mejora la capacidad regenerativa tras lesión muscular (Chiche et al., 2017) y que mejora aspectos relacionados con el envejecimiento y alarga la esperanza de vida (Ocampo et al., 2016).

1.5. APLICACIONES Y FUTURO DE LA REPROGRAMACIÓN CELULAR

El desarrollo de una estrategia de reprogramación celular basada en el uso de factores definidos ha permitido grandes avances en este campo, haciendo que esta técnica sea más accesible y que por lo tanto muchos laboratorios se interesen en sus potenciales aplicaciones.

Actualmente la reprogramación celular supone una potente herramienta en el campo de la medicina regenerativa y la terapia celular gracias a que facilita una fuente de células ilimitada derivadas del propio paciente y además reduce el riesgo de rechazo de estas. Otras aplicaciones clínicas que aporta la tecnología de las iPSC es la de obtención de células para realizar cribados de fármacos para el tratamiento de enfermedades sistémicas (Desbordes & Studer, 2013;

Imaizumi & Okano, 2014) o la reconstrucción parcial de órganos lesionados como hígados (S et al., 2015), vasos (Stabler et al., 2015) o huesos (Baptista et al., 2018).

Además de las aplicaciones clínicas que esta tecnología aporta existen otras como la posibilidad de estudiar la base molecular de ciertas enfermedades hereditarias (Ardhanareeswaran et al., 2017; Telias & Ben-Yosef, 2014) o la posibilidad de estudiar en mayor detalle los procesos de diferenciación celular y desarrollo de los diferentes tejidos y órganos, así como las modificaciones epigenéticas asociadas a diversos procesos como el cáncer.

2. Cáncer

2.1. CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DEL CÁNCER

El cáncer engloba un conjunto de diversas enfermedades que se caracterizan por presentar células que crecen de forma descontrolada y que tienen la capacidad de salir del tejido de origen pudiendo invadir otros. Esto es consecuencia de alteraciones genéticas, epigenéticas y transcripcionales que modifican la identidad celular confiriéndole una serie de características típicas de las células cancerígenas, principalmente: señalización sostenida de la proliferación, resistencia a la muerte celular, evasión de los supresores del crecimiento, activación de la capacidad invasiva y metástasis, capacidad proliferativa ilimitada y la capacidad de angiogénesis (Hanahan & Weinberg, 2011) (**Figura 4**). Recientemente se han añadido algunas nuevas como los cambios metabólicos que sufren las células durante el proceso de transformación celular hacia rutas de procesamiento de la glucosa no oxidativas con el objetivo de fomentar la proliferación celular (Heiden et al., 2009) y la evasión del sistema inmune (Hanahan & Weinberg, 2011).



Figura 4. Características de las células cancerígenas. En la figura se indican las principales características moleculares de las células cancerígenas. (Imagen modificada de Hanahan and Weinberg, 2011 con el permiso de Elsevier)

La capacidad proliferativa de las células está regulada por diversos mecanismos de control que controlan las divisiones celulares y la progresión de estas a lo largo del ciclo celular. En las células transformadas estos mecanismos se encuentran alterados. El proceso de transformación celular implica la mutación inactivadora de genes supresores de tumores, que son reguladores negativos de la proliferación, o bien, la mutación activadora de oncogenes, que estimulan la proliferación celular. Como resultado de estas mutaciones las células cancerígenas se caracterizan por presentar una inestabilidad genómica muy alta, puesto que presentan tasas de proliferación elevadas y los mecanismos encargados de corregir los errores durante la división celular no funcionan correctamente. Por lo tanto, la inestabilidad genómica de las células transformadas permite la acumulación de mutaciones en mayor grado en el que lo haría una célula normal y desemboca en la adquisición de las características citadas previamente (Hanahan & Weinberg, 2011).

Estas características moleculares de las células transformadas les confieren unas características fenotípicas concretas: capacidad proliferativa ilimitada y, en mayor o menor grado, capacidad de invasión de otros tejidos. Esto nos permite por lo tanto evaluar el estado transformado con ensayos *in vitro*; mediante ensayos de expansión

clonal para medir su capacidad de proliferación, ensayos de crecimiento en agar blando para evaluar la capacidad de crecimiento independiente de anclaje o ensayos en *transwell* que nos permiten evaluar la capacidad de migración e invasividad celular.

2.2. ONCOGENES: PROTEÍNAS DE LA FAMILIA RAS

Los oncogenes son reguladores positivos del ciclo celular, por lo tanto, mutaciones activadoras en estos pueden producir una proliferación descontrolada en la célula. Dentro de los oncogenes destacamos los que forman parte de la familia Ras por ser el primer oncogén humano aislado y encontrarse mutado en una gran cantidad de tumores humanos.

La familia está formada por 3 genes: *Hras*, *Kras* y *Nras*, que pese a presentar una alta homología de secuencia, poseen diferentes características y se expresan de manera diferencial en tejidos y órganos. Ejemplo de esto sería la función vital de *Kras* durante el desarrollo embrionario. La falta de *Kras* conduce a la muerte del embrión mientras que la ausencia de *Hras* o *Nras* no (Malumbres & Barbacid, 2003).

Las proteínas de la familia Ras son proteínas G monoméricas con actividad GTP (guanosín trifosfato) hidrolasa (Hurley et al., 1984). Actúan como interruptores moleculares presentando dos estados: activo, cuando la proteína Ras se une al GTP, e inactivo, cuando la proteína Ras hidroliza el GTP y se mantiene unida al GDP (guanosín difosfato) (**Figura 5**). Estas proteínas se encuentran unidas a la cara interna de la membrana plasmática y constituyen unos de los más importantes transductores de señales celulares, siendo los principales mediadores en la transducción de señales mitogénicas (Kamata & Feramisco, 1984; Mulcahy et al., 1985). En la regulación de la actividad de estas proteínas actúan dos tipos de factores: los Ras-GAPs (*Ras-GTPase Activating Proteins*), que estimulan la actividad hidrolasa de las proteínas Ras favoreciendo las hidrólisis del GTP a GDP y el paso de la forma activa a la inactiva (Trahey et al., 1988; Vogel et al., 1988) y los Ras-GEFs (*Ras-Guanine nucleotide Exchange Factor*), que promueven la liberación del GDP permitiendo así que las proteínas Ras capturen una nueva molécula de GTP y se activen (Downward et al., 1990; Wolfman & Macara, 1990) (**Figura 5**).

Finalmente se descubrió que la integración de la señal extracelular estaba mediada por receptores tirosín-quinasa acoplados a la proteína Grb2 que interacciona con Ras-GEF permitiendo la activación de Ras (McCormick, 1993).

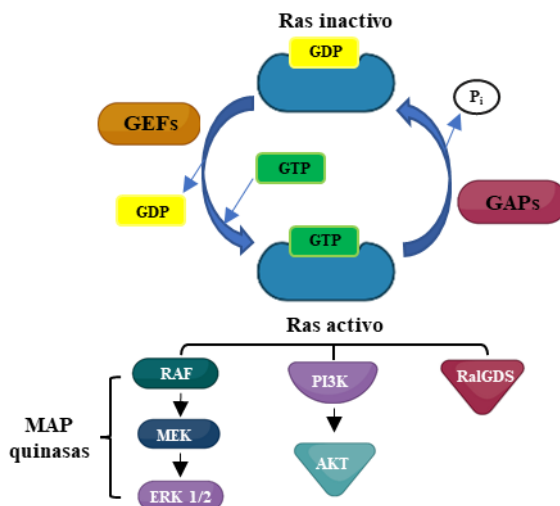


Figura 5. Regulación y principales efectores de las proteínas RAS. Esquema en el que se representa la regulación de las proteínas Ras (panel superior) y sus principales efectores (panel inferior).

2.2.1. Principales efectores y funciones de las proteínas Ras

Los principales efectores de las proteínas Ras son Raf, PI3K y RalGDS. Las proteínas de la familia Raf abarcan un conjunto de 3 serín-treonín quinastas: Araf, CraF y BraF, y representan el primer y principal efector de Ras descubierto (Moodie et al., 1993; Warne et al., 1993; X. F. Zhang et al., 1993). La interacción entre Ras-GTP y estas quinastas desencadena la activación de la vía de las proteínas quinastas activadas por mitógenos (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinase*). Raf fosforila a Mek que, una vez fosforilada y activa, fosforila y activa a Erk1/2 (*Extracelular signal-Regulated Kinase 1/2*) que transduce la señal al núcleo y regula la expresión génica actuando sobre factores de transcripción de la familia ETS (Wood et al., 1992) favoreciendo la proliferación celular (**Figura 5**).

El otro principal efector de las proteínas Ras es PI3K (Rodríguez-Viciano et al., 1994). La activación de PI3K permite la activación de la serín-treonín quinasa Akt. A su vez Akt actúa sobre diferentes efectores llevando a cabo funciones como la inhibición de la apoptosis y la estimulación de la supervivencia al actuar sobre miembros de la familia Bcl-2 y NF κ B (Downward et al., 1990) o la estimulación de la proliferación celular al activar mTOR e inactivar supresores tumorales como p21 (Manning & Cantley, 2007). Además, se ha demostrado que la generación de ratones mutantes para PI3K que impide su unión con Ras aumenta altamente la mortalidad a edades cortas, lo que demuestra la importancia de esta vía de señalización (Murillo et al., 2014) (**Figura 5**).

Como último efector que interacciona directamente con Ras, tenemos al estimulador de disociación de nucleótidos de guanina de Ral (RalGDS, *Ral guanine nucleotide dissociation stimulator*) (Hofer et al., 1994; Kikuchi et al., 1994; Spaargaren & Bischoff, 1994), formado por GTPasas que participan en procesos de proliferación y supervivencia (Chien & White, 2003). Esta vía está menos estudiada que las anteriores y presenta menos relevancia en cuanto a la respuesta celular mediada por Ras, pero se sabe que también participa en procesos de tumorigénesis (**Figura 5**).

2.2.2. Ras en cáncer y como modelo para el estudio del cáncer

Las proteínas de la familia Ras son los oncogenes que aparecen mutados con mayor frecuencia en los cánceres humanos. Dentro de los miembros de la familia Ras el más importante es *Kras*, que representa un 85% de las mutaciones detectadas en los miembros de esta familia y se correlacionan con alrededor de un millón de muertes por cánceres asociados a estas mutaciones, seguido por *Nras* con un 12% y *Hras* con un 3%. Además, se han detectado mutaciones en los diferentes miembros de la familia asociados con diferentes tipos de cáncer: mutaciones en *Kras* asociadas con cáncer de pulmón, endometrio, páncreas y colon, mutaciones en *Nras* asociadas con cáncer de tiroides y melanoma y mutaciones en *Hras* asociadas con cáncer de vejiga o de timo (Simanshu et al., 2017).

A nivel molecular, las mutaciones en Ras asociadas con el proceso de transformación celular implican una activación mayor a la que se produciría en condiciones normales, siendo las más frecuentes las que afectan a los codones 12, 13 o 61. El reemplazo en los codones 12 o 13 de la glicina por cualquier otro aminoácido, excepto prolina, genera un bloqueo estérico que evita que el dedo de arginina de las Ras-GAP entre en el sitio de unión a la GTPasa y promueva su hidrólisis, manteniendo así el estado activo de Ras de forma permanente (Scheffzek et al., 1997). En la posición 61 de la proteína encontramos una glutamina que forma parte del mecanismo de hidrólisis de GTP, por lo que mutaciones en este residuo impiden la hidrólisis del GTP tanto a nivel intrínseco como en la mediada por las RasGAP (McGrath et al., 1984; Sweet et al., 1984) generando una situación similar a la producida por las mutaciones en las posiciones 12 o 13.

Debido a la importancia de Ras en el proceso de transformación celular se han desarrollado modelos animales de desarrollo tumoral basados en mutaciones en estas proteínas. Concretamente el ratón *KrasV12-KI*, que se caracteriza por portar en el locus endógeno una copia de la variante mutada de *Kras*, *KrasV12* que se caracteriza por codificar para una forma permanentemente activa de *Kras* (Guerra et al., 2003). En condiciones normales el alelo está precedido por una señal de stop que se encuentra flanqueada por secuencias de recombinación loxP, por lo que el tratamiento con la recombinasa CRE elimina este codón de stop y permite la expresión de *KrasV12*, lo que permite activar la expresión de esta proteína en los tejidos de interés. Este sistema está ampliamente extendido como modelo para el estudio de la iniciación tumoral en pulmón. La expresión de *KrasV12* provoca la formación de adenomas que en algunos progresan a adenocarcinomas pulmonares (Collado et al., 2005; Guerra et al., 2003)

2.3. SUPRESORES DE TUMORES

Los genes supresores de tumores son reguladores negativos del ciclo celular, por lo tanto, mutaciones inactivadoras en ellos pueden producir una proliferación descontrolada en la célula al perderse mecanismos encargados de detener el proceso de división celular cuando las condiciones no son las adecuadas. Entre los supresores de tumores más

importantes se encuentran: las proteínas *pocket* de la familia de retinoblastoma, los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina (CDKis, *Cyclin-dependent kinases inhibitors*) y p53.

2.3.1. Proteínas *pocket* de la familia de retinoblastoma

El primer paso en el proceso de división celular implica la replicación del ADN. En el ciclo celular, del que hablaremos detalladamente en siguientes apartados, esto supondría el paso de la fase G1 a la fase S en la que se sintetiza el ADN. La transición entre estas fases del ciclo es fundamental puesto que determina que la célula inicie el proceso de división celular y por ello está estrictamente regulada por diferentes grupos de proteínas que interactúan entre sí.

Las proteínas *pocket* de la familia de retinoblastoma incluye a las proteínas pRB, p130 y p107, que comparten una alta homología estructural y funciones moleculares comunes (Ewen et al., 1991; Wen-Hwa et al., 1987). Todas actúan como reguladores negativos del ciclo celular mediante la interacción con factores de transcripción de la familia E2F. Estos factores regulan la transcripción de varios genes necesarios para que la célula inicie el proceso de replicación del ADN, por lo que la regulación negativa de los mismos por las proteínas de la familia *pocket* bloquea el avance en el ciclo celular (Johnson & Schneider-Broussard, 1998). La actividad de las proteínas de la familia *pocket* está regulada por las quinasas dependientes de ciclina (Cdks, *Cyclin-dependent kinases*). La fosforilación de determinados residuos en estas proteínas por las Cdks las inactiva, lo que permite que la célula avance en el ciclo e inicie el proceso de división celular (Cobrinik, 2005; Dick & Rubin, 2013).

Dentro de esta familia, se considera que el supresor tumoral más importante es pRB puesto que se encuentra inactivado en una gran cantidad de tumores humanos, mientras que los otros dos miembros de la familia rara vez aparecen afectados (Friend et al., 1986; Horowitz et al., 1989; E. Y. H. P. Lee et al., 1988; Medema et al., 1995). Además, diferentes estudios con modelos transgénicos de ratón indican que la función de pRB es diferente y exclusiva para esta proteína al observar cómo los ratones *Knockout* para pRB no completaban el proceso de desarrollo embrionario mientras que ratones deficientes para uno de los

otros dos miembros sí lo hacían, lo que indica un papel solapante por parte de p130 y p107 (Cobrinik et al., 1996; Jacks et al., 1992). También se observó cómo ratones heterocigotos para pRB desarrollan tumores en hipófisis y tiroides, lo que demuestra la importancia de esta proteína como supresor tumoral. Además del papel como supresores tumorales se ha descubierto que las proteínas de esta familia participan en los procesos de diferenciación celular, en la biología de las células madre (Indovina et al., 2013; Sage, 2012) y regulan genes relacionados con la pluripotencia como Sox2 (Vilas et al., 2015).

2.3.2. Inhibidores de Cdk

En la transición entre la fase G1 y S del ciclo celular juegan un papel importante las Cdk, que forman dímeros al unirse a ciclinas y fosforilan e inactivan a las proteínas *pocket* permitiendo así la activación de los factores de la familia E2F que inician el proceso de síntesis de ADN. Las Cdk, a su vez, están reguladas por inhibidores que pertenecen a dos familias distintas; la familia Ink4, formada por p16, p15, p18 y p19ink4d, y la familia Cip/Kip, formada por p21, p27 y p57 (Sherr & Roberts, 1999).

2.3.2.1. Familia INK4

Los miembros de la familia INK4 se unen a Cdk4 y Cdk6 e inhiben su actividad al interferir en la unión de estas Cdk con la ciclina D, lo que bloquea la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular al impedir la fosforilación de las proteínas *pocket* de retinoblastoma (Sherr & Roberts, 1999).

El locus *INK4a/ARF/INK4b*, también llamado *CDKN2a* y *CDKNA2b*, codifica para las proteínas de la familia y se encuentra mutado en un amplio tipo de tumores pancreáticos, pulmonares o melanomas, entre otros (Sherr, 2012).

2.3.2.2. Familia Cip/Kip

Los miembros de la familia Cip/Kip, a diferencia de los anteriores, se pueden unir tanto a las Cdk como a los complejos ciclina/Cdk y presentan un espectro de acción más amplio que modula la actividad de las ciclinas D, E, A y B (Sherr & Roberts, 1999) así

como a las Cdk 4, 6 y 2, lo que les permite regular diferentes fases del ciclo celular (Besson et al., 2008). Los miembros de esta familia son: p21, codificado por el gen *Cdkn1a* (El-Deiry et al., 1993; Xiong et al., 1993), p27, codificado por *Cdkn1b* (Polyak et al., 1994; Toyoshima & Hunter, 1994) y p57, codificado por *Cdkn1c* (M. H. Lee et al., 1995). Todos comparten un dominio común en su extremo N- terminal con el que interaccionan con las ciclinas y las Cdks, pero difieren en el resto de su secuencia, lo que indica que estas proteínas tienen diferentes funciones.

Diversos estudios han demostrado funciones comunes en estas proteínas durante procesos como el desarrollo embrionario, la diferenciación o la respuesta al estrés celular (Sherr & Roberts, 1999). Sin embargo, también se ha descrito que cada uno de los miembros tiene funciones biológicas específicas. Por ejemplo, p21 es una importante diana de p53 participando en la detención del ciclo celular en las fases G1 y G2 si se detecta daño en ADN (El-Deiry et al., 1993; Gartel & Tyner, 1999) y también participa en los procesos de apoptosis, mientras que la expresión de p27 suele ser elevada en células quiescentes o con niveles de señales mitogénicas bajas (Besson et al., 2006). Además, se ha demostrado que p27 participa en la represión de Sox2 durante el proceso de diferenciación celular (H. Li et al., 2012). Se ha demostrado también que p57 es la única proteína de esta familia imprescindible para el correcto desarrollo embrionario. Ratones deficientes para el gen *Cdkn1c* presentan diferentes anomalías durante el desarrollo y mueren en el nacimiento (P. Zhang et al., 1997). Debido a que cada proteína tiene funciones específicas la regulación de su expresión es diferente y se activa según los requerimientos de la célula. Por este motivo los miembros de esta familia se encuentran diferencialmente expresados según el tipo y el contexto celular.

Aunque en un principio se describió el papel de estas proteínas como reguladores negativos del ciclo celular y su papel como supresores tumorales ha quedado claro en diferentes estudios de progresión tumoral en ratones deficientes para estas proteínas (Fero et al., 1996; Nakayama et al., 1996), actualmente se conoce que sus funciones van más allá de la regulación del ciclo celular y que están implicadas en una amplia variedad de procesos como la apoptosis, la

migración celular o la regulación de la expresión génica al interactuar directamente con factores de transcripción como los de la familia E2F y que, además, en algunas situaciones su papel puede ser oncogénico dependiendo del contexto celular.

2.3.3. p53

La proteína p53 es considerada como el supresor tumoral más importante. En respuesta a diferentes señales de estrés celular como el daño en el ADN, sobreactivación de señales mitogénicas, estrés oxidativo, falta de nutrientes o de nucleótidos, actúa produciendo parada del ciclo celular, apoptosis o senescencia (Hu et al., 2012; D. P. Lane, 1992). Además de su papel como supresor tumoral, más de la mitad de los cánceres humanos esporádicos presentan mutaciones en p53 y se ha estudiado cómo los individuos que padecen el síndrome Li-Fraumeni, que heredan un alelo mutado para p53, o los ratones transgénicos deficientes para p53 presentan una mayor incidencia de tumores (Brady & Attardi, 2010). P53 también tiene un papel importante regulando otros procesos celulares como el metabolismo, el mantenimiento de las células madre y la comunicación celular (Vousden & Prives, 2009).

La regulación de la actividad de p53 se produce en respuesta a los estímulos mencionados. En este contexto, p53 se separa de sus reguladores negativos MDM2 y MDM4, que en condiciones de reposo lo ubiquitinan para su degradación por el proteosoma, se estabiliza y lleva a cabo las diferentes respuestas antiproliferativas en función de la gravedad del daño que el estrés haya desencadenado en la célula.

3. Reprogramación celular y cáncer

3.1. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS COMUNES

La transformación y la reprogramación celular comparten características comunes, tanto en el fenotipo celular que se obtiene, como en los mecanismos activados durante ambos procesos.

Durante el proceso de reprogramación se altera la identidad celular, las células somáticas diferenciadas se convierten en iPSCs, caracterizadas por presentar capacidad de autorrenovación y una capacidad proliferativa ilimitada (Yamanaka, 2009). Durante la transformación celular sucede algo similar, la identidad celular también es alterada y las células tumorales resultantes adquieren una capacidad proliferativa ilimitada gracias a que logran eludir las señales antiproliferativas y de entrada en senescencia (Hanahan & Weinberg, 2011). Las iPSCs se caracterizan por ser células pluripotentes ya que la reprogramación celular implica un proceso de desdiferenciación (Takahashi & Yamanaka, 2006). Esto también se observa en mayor o menor grado en algunos tipos de tumores anaplásicos. Además, algunos estudios indican similitudes a nivel metabólico entre las iPSCs y las células cancerosas (Varum et al., 2011).

3.2. MECANISMOS COMUNES

Además de las similitudes en las células resultantes de ambos procesos, también se observan mecanismos comunes activados durante la reprogramación y la transformación celular.

3.2.1. Factores de reprogramación

Los factores OSKM, utilizados para la generación de iPSCs, además de presentar un papel importante en procesos relacionados con la pluripotencia, se han relacionado con diferentes tipos de cáncer, por ejemplo: Oct3/4 se ha descrito como un marcador para tumores de células germinales como seminomas y carcinomas embrionarios (Gidekel et al., 2003) y su sobreexpresión en células somáticas adultas provoca crecimiento displásico en tejidos epiteliales al evitar la diferenciación (Hochedlinger et al., 2005). Sox2 aparece amplificado en carcinomas de células escamosas de pulmón y esófago (Bass et al.,

2009) y se considera un factor esencial para el mantenimiento de las células cancerosas en glioblastomas, cáncer de mama y el sarcoma de Ewing (Riggi et al., 2010; Sarkar & Hochedlinger, 2013). Klf4 presenta un papel dual, se ha descrito que promueve el desarrollo de cáncer de mama y piel, pero limita el desarrollo de cáncer gástrico, colorrectal y de vejiga al activar al supresor tumoral p21 (Rowland & Peeper, 2006). Finalmente, ejemplo más claro es el de c-Myc, que se asocia con una amplia variedad de cánceres humanos (Beroukhim et al., 2010) (**Figura 6**). Además, se ha demostrado cómo células parcialmente reprogramadas presentan fenotipos relacionados con el estado transformado (Knappe et al., 2016; Nishi et al., 2014; Ohnishi et al., 2014; Shibata et al., 2018).

Estos ejemplos demuestran cómo los factores de reprogramación utilizados para la obtención de iPSCs están también implicados en multitud de procesos de carcinogénesis, por lo que los mecanismos activados durante la reprogramación celular y la carcinogénesis presentarán similitudes.

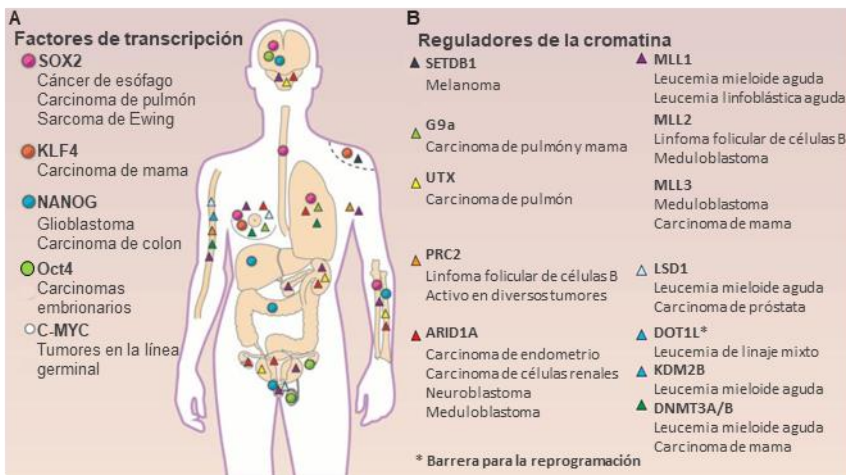


Figura 6. Mecanismos genéticos comunes entre los procesos de reprogramación y transformación celular. (A) Se indican algunos de los procesos tumorales en los que participan los diferentes factores de reprogramación. (B) Se muestran reguladores de la cromatina que ejercen cambios comunes durante ambos procesos. (Imagen adaptada de Suvà et al., 2013. Con el permiso de The American Association for the Advancement of Science).

3.2.2. Cambios epigenéticos

Tanto la reprogramación celular como la transformación oncogénica implican la adquisición de nuevos programas de desarrollo celular que modifican la identidad celular inicial. En la implementación de estos nuevos programas el componente epigenético juega un papel fundamental. Las similitudes entre ambos procesos se manifiestan no solo por la existencia de mecanismos activados similares, si no también por identificarse potenciadores y barreras comunes (Orkin & Hochedlinger, 2011).

La expresión de los factores de reprogramación produce un borrado epigenético en la célula parental que permite la reversión del estado diferenciado, caracterizado por el silenciamiento asociado con modificaciones epigenéticas que aumentan el grado de compactación de la cromatina de genes relacionados con el estado diferenciado y permite la expresión de genes relacionados con el estado pluripotente, a uno desdiferenciado y pluripotente (Apostolou & Hochedlinger, 2013). Por otro lado, como describimos anteriormente, el cáncer presenta un importante componente epigenético.

Se han descrito diversas proteínas que participan en las modificaciones epigenéticas en algunos tipos de cáncer y que afectan a la eficiencia del proceso de reprogramación celular (Suvà et al., 2013), como por ejemplo la desmetilasa de histonas H3K4, Lsd1, o la histona metil-transferasa G9a, que aumentan la eficiencia del proceso de reprogramación y se asocian con el desarrollo de diversos tipos de cáncer (Dawson & Kouzarides, 2012; Harris et al., 2012; Kondo et al., 2007; Yan Wang et al., 2009), entre otras (**Figura 6**).

Pese a que en ambos procesos se producen modificaciones epigenéticas en ocasiones mediadas por los mismos efectores, el programa epigenético activado durante el proceso de reprogramación celular difiere del activado durante los procesos de carcinogénesis. Esto se demuestra en estudios en los que se han intentado reprogramar células transformadas utilizando individualmente los factores de reprogramación, obteniendo células no pluripotentes y con fenotipos más agresivos que la célula de la que derivan. Por lo tanto, es necesaria la cooperación conjunta de los factores de reprogramación para activar

completamente el programa de reprogramación (Kim & Zaret, 2015; Kumar et al., 2012).

3.2.3. Supresores tumorales y oncogenes

Como vimos en anteriores apartados, la transformación celular puede ser resultado de mutaciones inactivadoras en los supresores tumorales o de mutaciones activadoras en oncogenes. La contribución de los supresores tumorales y de los oncogenes durante el proceso de reprogramación celular también se ha estudiado.

En el caso de los supresores tumorales, se ha identificado que algunos de los más importantes como el eje p53/p21 y el locus *Ink4/Arf*, actúan como barreras que se oponen al proceso de reprogramación celular. Por un lado, la activación de OSKM produce un aumento en la señalización del eje p53/p21 que se relaciona con eficiencias de reprogramación bajas. Se ha demostrado que la inhibición de p53, p21 o el bloqueo de la apoptosis aumenta notablemente la eficiencia del proceso de reprogramación celular tanto en células primarias de ratón como humanas (Kawamura et al., 2009). Otros estudios demuestran que la activación previa de p53 en las células a reprogramar, causada por diversos estímulos como el acortamiento telomérico, deficiencias en los mecanismos de reparación del ADN o daño exógeno sobre el ADN, reduce todavía más la eficiencia del proceso de reprogramación (Marión et al., 2009). Estos estudios demuestran que p53 actúa como una barrera para el proceso de reprogramación celular al responder al daño causado por la activación de los factores de reprogramación produciendo la entrada en apoptosis (Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009).

En el caso del locus *Ink4/Arf*, que codifica para p16 y Arf, se ha observado que en células pluripotentes como ESCs o iPSCs se encuentra silenciado, mientras que en células diferenciadas mantiene un nivel de expresión basal que puede ser aumentado en respuesta a señales mitogénicas aberrantes como la expresión de los factores de reprogramación, lo que es indicativo de que durante el proceso de reprogramación se produce su silenciamiento para permitir la proliferación de las células a reprogramar y la culminación del proceso. Además, se ha comprobado que el silenciamiento del locus *Ink4/Arf* se

produce en MEFs que bloquean las vías de pRB y p53 al expresar el antígeno Large-T del virus SV40, por lo que esto demuestra que no se trata de un proceso selectivo que favorezca a aquellas células que expresan niveles bajos del locus, si no de un proceso intrínseco a la reprogramación celular (H. Li et al., 2009).

También se demuestra el papel del locus como barrera al proceso de reprogramación al observar una bajada en la eficiencia de reprogramación en células derivadas de individuos envejecidos o células que han acumulado pases en cultivo, lo que aumenta la expresión de p16 y promueve la entrada en senescencia replicativa. La inmortalización por inhibición de este y los anteriores mecanismos supresores de tumores indicados aumenta la eficiencia del proceso de reprogramación al impedir que se establezcan estas barreras, lo que demuestra el papel de estas vías como limitantes para el proceso de reprogramación celular (Banito et al., 2009; H. Li et al., 2009; Utikal et al., 2009).

Por otro lado, se ha comprobado que la expresión de los factores de reprogramación combinada con algunos oncogenes aumenta la eficiencia del proceso de reprogramación celular. Por ejemplo, se ha demostrado cómo la expresión de la forma activa de oncogenes de la familia Ras aumenta la eficiencia del proceso de reprogramación celular (Ferreirós et al., 2019).

En conjunto, estos datos indican que los procesos de reprogramación y transformación celular comparten mecanismos y barreras comunes (**Figura 7**). La expresión de los factores de reprogramación en la célula produce daño en el ADN y la consiguiente activación de los mecanismos supresores de tumores, que también se activan durante el proceso de carcinogénesis, con el objetivo de impedir la proliferación de estas células dañadas al inducir su salida del ciclo por apoptosis o senescencia. La eliminación de estas barreras durante la reprogramación celular aumenta la eficiencia del proceso, pero también aumenta la inestabilidad genómica de las iPSCs resultantes, lo que como comentamos en apartados anteriores, es un importante factor limitante para sus aplicaciones clínicas.

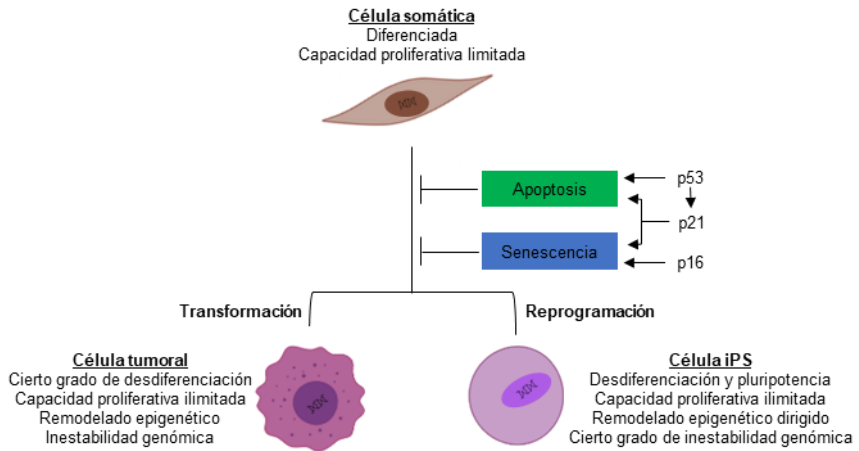


Figura 7. Similitudes y diferencias entre los procesos de reprogramación y transformación celular. Se representan las principales barreras para ambos procesos y las principales características de las células obtenidas.

3.3. REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS TUMORALES

La estrategia de reprogramación basada en el uso de factores definidos desarrollada en el año 2006 ha supuesto un gran avance en el campo de la reprogramación celular, aumentado considerablemente el número de tipos celulares que se han podido reprogramar. Sin embargo, los estudios en los que se han logrado reprogramar células transformadas son escasos y las iPSCs obtenidas presentan una serie de limitaciones que veremos a continuación (Kim, 2020).

Como describimos en apartados anteriores, los procesos de transformación y reprogramación celular comparten mecanismos y barreras comunes, por lo que cabría esperar que la reprogramación de células transformadas fuese un proceso asequible y eficiente. Sin embargo, los intentos de reprogramación de diversos tipos de células transformadas demuestran la dificultad del proceso, lo que es indicativo de la existencia de barreras intrínsecas en las células transformadas que se oponen al cambio en la identidad celular que supone la reprogramación. Este es un punto muy importante, puesto que la reprogramación celular se podría utilizar como herramienta para el estudio de estas barreras, que representarían componentes específicos

de cada tipo celular transformado, por lo que su identificación ayudaría a comprender la base molecular subyacente al cáncer y su posible tratamiento.

Uno de los principales problemas que presentan las células transformadas es su heterogeneidad. El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por presentar células con una proliferación descontrolada y la capacidad para invadir otros tejidos, pero este fenotipo puede ser el resultado de alteraciones muy diversas que incluyen mutaciones en los genes supresores de tumores, oncogenes y alteraciones epigenéticas. Por lo que la resistencia que presentan a ser reprogramadas también es muy variable y es difícil establecer generalizaciones, por este motivo nos centraremos en algunos ejemplos concretos de estudios representativos del potencial uso de la reprogramación celular en cáncer, centrándonos en la reprogramación mediante el uso de factores definidos.

Bernhardt y colaboradores intentaron reprogramar células de melanoma caracterizadas por presentar mutaciones en BRAF^{V600E} y NRAs mediante la introducción de los factores OSK. Como resultado, obtuvieron células similares a iPSCs con un estado metaestable, puesto que eran dependientes de la expresión exógena de OSK. La caracterización *in vivo* de estas células demostró su capacidad para formar teratomas que no contenían células de melanoma. *In vitro*, estas iPSC presentaban la capacidad de diferenciarse en otros linajes celulares como neuronas o fibroblastos y, además, a diferencia de las células parentales, no presentaban sensibilidad a inhibidores de MAPK. Estos resultados indican el cambio de identidad de estas iPSC metaestables con respecto a la población parental (Bernhardt et al., 2017). Este estudio nos demuestra el potencial que la reprogramación de células cancerosas tiene para el estudio de la resistencia o respuesta a terapias contra el cáncer dependiendo del estado celular.

Zhang y colaboradores intentaron reprogramar varias líneas de sarcoma utilizando los factores OSKM combinados con Lin28 y Nanog. Las células resultantes expresaban marcadores de pluripotencia y se lograba una diferenciación dirigida en células de endodermo y ectodermo. El análisis epigenético de los patrones de metilación indica que estas células se parecen más a células madre mesenquimales que a

las células madre embrionarias o a las células de sarcoma parentales. Pese a que no mostraron capacidad para formar teratomas cuando se inyectaron en ratones, su caracterización demostró una reducción en la tumorigenicidad de las células obtenidas y de sus derivados diferenciados con respecto a la línea parental (X. Zhang et al., 2013). Este estudio es indicativo de que el proceso de reprogramación celular puede alterar o reestablecer las modificaciones epigenéticas asociadas con el cáncer, manteniéndose estas modificaciones en las células generadas y en las células diferenciadas obtenidas, lo que demuestra el posible uso terapéutico de la reprogramación celular en cáncer.

Finalmente, Kim y colaboradores, intentaron reprogramar células de adenocarcinoma ductal pancreático primario (PDAC, *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*), caracterizado por tener un mal pronóstico ya que generalmente se detecta demasiado tarde para ser tratado de forma efectiva al no existir marcadores fiables de detección temprana, mediante la introducción de OSKM. Los modelos que se utilizan actualmente solo recogen información sobre estados avanzados del cáncer y no sobre las etapas iniciales. Las células similares a iPSCs obtenidas requerían la expresión exógena de los factores para conservarse en este estado y se caracterizaban por formar lesiones ductales similares a las que se observan en los estados iniciales de PDAC cuando se inyectaban en ratones inmunodeprimidos, así como por presentar mutaciones características de PDAC, indicativo de que derivan de células con un estado más avanzado de la enfermedad. De 6 a 9 meses tras inyección observaron cómo estas lesiones progresaban a la etapa invasiva y más avanzadas de PDAC, lo que indica que estas células similares a iPSCs derivadas de PDAC replicaron el desarrollo de la enfermedad desde un estado temprano. El análisis proteómico de las lesiones tempranas generadas en ratones inmunodeprimidos y causadas por estas células permitió identificar proteínas humanas y las rutas en las que están implicadas, aumentando en el conocimiento de los estados iniciales de la enfermedad e identificando potenciales marcadores de detección temprana (Kim et al., 2013, 2017). Este estudio demuestra el potencial de la reprogramación celular para establecer modelos de desarrollo tumoral que permiten aumentar el conocimiento sobre la enfermedad y las vías implicadas, permitiendo la

identificación de nuevos biomarcadores para su detección o de nuevas dianas terapéuticas.

Estos solo son unos ejemplos que ilustran los posibles usos que la reprogramación celular puede tener en el estudio del cáncer. Como vemos, tanto las células obtenidas tras el proceso de reprogramación como la estrategia utilizada son muy heterogéneas y dependen en gran medida de la línea parental. Además, la reprogramación no se culmina de forma completa puesto que las células obtenidas no son iPSCs estables. No obstante, este campo de aplicación de la reprogramación celular es muy prometedor.

4. Ciclo celular, senescencia y apoptosis

4.1. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR Y CARCINOGENESIS

El ciclo celular es la secuencia de eventos a través de los cuales una célula duplica su ADN, crece y se divide en dos células hijas. El ciclo celular se divide en cuatro fases: después de la división celular las células recién formadas experimentan un período de crecimiento en el que sintetizan macromoléculas como proteínas, ARN o membranas, esta se corresponde con la denominada fase G1. En la siguiente fase se realiza la síntesis de ADN con el objetivo de duplicarlo. Acto seguido, la célula atraviesa una etapa en la que vuelve a crecer y tras esta, el ADN sintetizado se reparte equitativamente en las células hijas resultantes produciéndose la división celular. Estos procesos se realizan en las fases S, G2 y M, respectivamente. Las células que no se dividen salen del ciclo celular en la fase G1 entrando en una fase de reposo denominada G0 (**Figura 8**).

El avance de la célula a través de las diferentes fases del ciclo está estrictamente regulado y existen los denominados puntos de control en los que se determina si las células están en condiciones óptimas para avanzar en el proceso de división celular y pasar a la siguiente fase. Un papel fundamental en estos puntos de control y en el avance a través del ciclo es el llevado a cabo por las quinasas dependientes de ciclina

(CDKs, *Cyclin-Dependent Kinases*) y por ciclinas que regulan su actividad. Estos complejos a su vez actúan sobre otros reguladores del ciclo permitiendo el avance a la siguiente fase siempre que se cumplan las condiciones adecuadas. Se ha demostrado el papel central de estas proteínas en el avance en el ciclo, puesto que la inactivación de las Cdk previene la mitosis (Devault et al., 1991; Parker & Piwnica-Worms, 1992; Van Den Heuvel & Harlow, 1993).

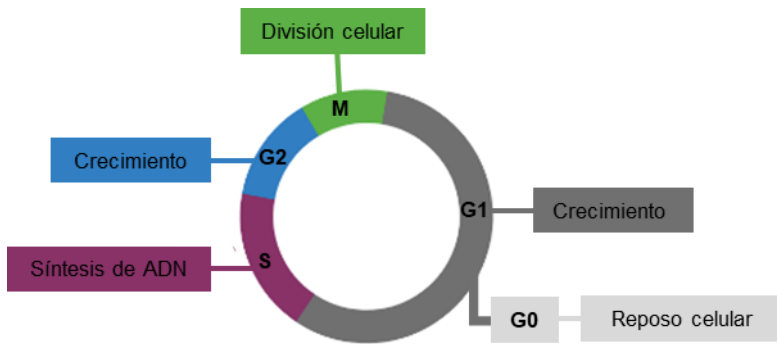


Figura 8. Esquema del ciclo celular. Imagen en la que se representan las fases del ciclo celular y los procesos que se realizan en cada una de ellas.

Dentro de los puntos de control el que se considera más importante es el que determina el avance de la fase G1 a la fase S, puesto que implica la entrada de la célula en una nueva ronda de división. En este punto cabe destacar el papel de los complejos Cdk4/6-ciclina D y Cdk2-ciclina E, que actúan fosforilando e inactivando a las proteínas *pocket* de la familia de retinoblastoma, lo que permite la liberación de los factores de transcripción de la familia E2F, que a su vez activan el programa transcripcional que permite el inicio de la división celular (Bloom & Cross, 2007; Van Den Heuvel & Dyson, 2008). Pero no es el único, por ejemplo, se conocen puntos de control en la fase S regulados por el complejo Cdk2-ciclina A (Fung & Poon, 2005), en la fase G2 regulados por el complejo Cdk1-ciclina A o en la fase M por el complejo Cdk1-ciclina B (Chen & Poon, 2008). En estos puntos de control se evalúa el correcto desarrollo del proceso de división celular, si se detectan problemas, como por ejemplo daño en el ADN, la célula se retira del ciclo con el objetivo de subsanar el problema, si este es

irreparable se la retirará definitivamente del ciclo pudiendo entrar en senescencia o apoptosis.

Tanto los supresores de tumores como los oncogenes están conectados con el ciclo celular. Por un lado, las células deben integrar señales mitogénicas para iniciar la división celular y la entrada en ciclo. Muchos oncogenes forman parte de las vías de señalización que median en la integración de estas señales. Por ejemplo, las proteínas de la familia Ras son uno de los principales mediadores en la transducción de señales mitogénicas (Kamata & Feramisco, 1984; Mulcahy et al., 1985) y a su vez, constituyen los oncogenes que aparecen más frecuentemente mutados en cáncer. Por otro, en los puntos de control del ciclo participan numerosas proteínas implicadas en diversas vías de señalización, existiendo tanto oncogenes implicados, como por ejemplo ciclinas como la D1 cuya sobreexpresión se ha identificado en cáncer de mama (S. Y. Zhang et al., 1994) y cáncer escamoso de cabeza y cuello (Xu et al., 1994), como supresores de tumores, como por ejemplo pRB cuya inactivación se ha detectado en numerosos cánceres humanos (Burkhart & Sage, 2008) o inhibidores de Cdks como p16 cuya pérdida se ha detectado en varios tipos de melanoma (Bartkova et al., 1996; Kamb et al., 1994).

El control del ciclo implica un equilibrio entre la actividad de oncogenes y supresores de tumores. La sobreactivación de los primeros o la inactivación de los segundos provoca que los mecanismos de control del ciclo fallen, pudiendo dar lugar a eventos de proliferación celular descontrolada que caracterizan al proceso de carcinogénesis. Además, el fallo en los mecanismos de control a lo largo del ciclo favorece que la célula acumule mutaciones, aumentando la inestabilidad genética y siendo esta también una característica principal de las células tumorales.

4.2. SENESCENCIA

4.2.1. Causas y funciones de la senescencia celular

La senescencia se define como una parada estable del ciclo celular. Fue descrita por primera vez en la década de los sesenta en estudios realizados con fibroblastos humanos en los que se observó que a medida que las células acumulaban divisiones celulares disminuían su

capacidad proliferativa progresivamente, hasta alcanzar un estado final senescente, en el que perdían completamente la capacidad de dividirse (Hayflick, 1965; Hayflick & Moorhead, 1961). A este tipo de senescencia se le denominó senescencia replicativa y se asocia con el acortamiento telomérico que sufren las células en ausencia de la enzima telomerasa tras divisiones sucesivas, lo que desencadena en señales de daño en el ADN y la activación del programa de senescencia (Bodnar et al., 1998; D’Adda Di Fagagna et al., 2003).

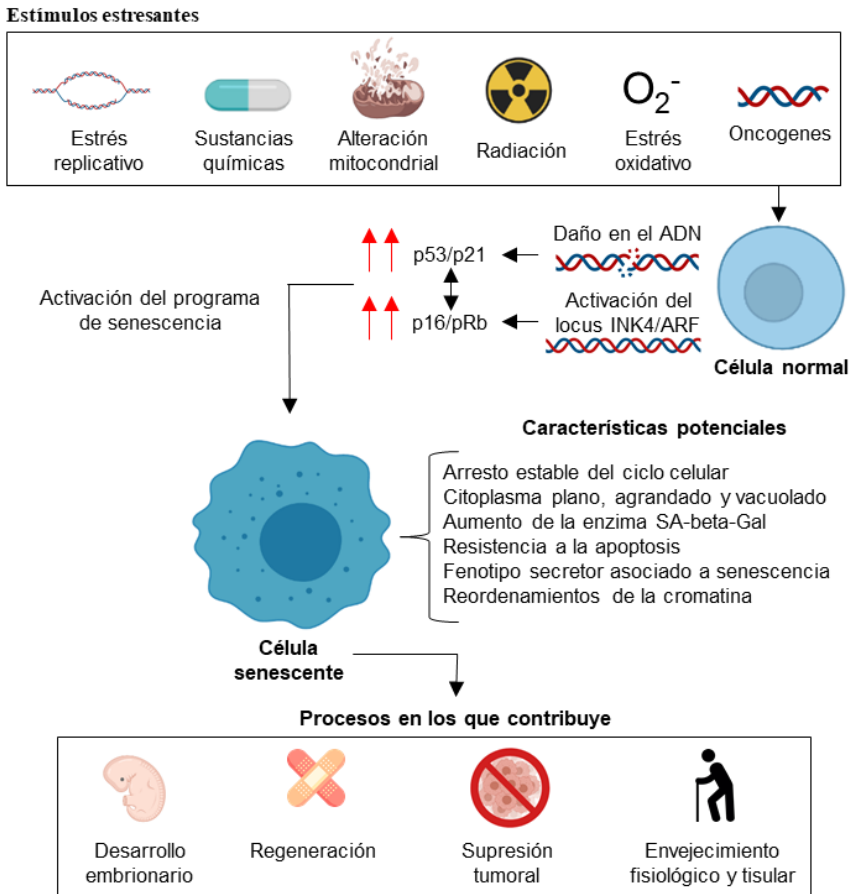


Figura 9. Senescencia celular. Imagen en la que se describen las principales características del proceso de senescencia celular. Se indican los principales estímulos estresantes que pueden disparar el programa de senescencia, las principales rutas activadas en respuesta a estos, las principales características de las células senescentes y los procesos en los que participan.

Actualmente se ha demostrado que la senescencia participa en diversos procesos biológicos: durante el desarrollo (Muñoz-Espín et al., 2013; Storer et al., 2013), durante procesos de regeneración tras daño (Demaria et al., 2014; Jun & Lau, 2010), también se ha identificado como una respuesta protectora activada en situaciones de estrés celular como por ejemplo limitando la proliferación de células preneoplásicas y previniendo el desarrollo de malignidades, lo que convierte a la senescencia celular en un potente mecanismo para frenar el proceso de carcinogénesis (Collado & Serrano, 2010). Además de estos efectos beneficiosos, también se ha descrito el papel de la senescencia celular en procesos de envejecimiento y en enfermedades relacionadas con la edad (**Figura 9**) (Childs et al., 2015; Van Deursen, 2014), por ejemplo, se observa una correlación entre la acumulación de células senescentes y el envejecimiento tisular (Krishnamurthy et al., 2004) así como una mejora en la esperanza de vida y en enfermedades asociadas con el envejecimiento en ratones que presentan envejecimiento normal cuando se eliminan selectivamente las células senescentes de los tejidos (Baar et al., 2017; Baker et al., 2016; J. Chang et al., 2016; Childs et al., 2016; Demaria et al., 2017) (**Figura 9**).

Se han descrito diversos estímulos o condiciones capaces de activar el programa de senescencia celular, generalmente se asocian con la activación de señales de daño persistente en el ADN causadas tanto por factores intrínsecos; como el estrés oxidativo y la disfunción mitocondrial (Chapman et al., 2019; Wiley et al., 2016), el acortamiento telomérico previamente descrito, la hiperproliferación producida por la activación oncogénica o por la inactivación de supresores tumorales (Alimonti et al., 2010; Collado et al., 2005; Michaloglou et al., 2005; A. P. Young et al., 2008), como por factores extrínsecos; radiación ultravioleta, radiación gamma o diversos quimioterápicos que promueven el daño en el ADN (D'Adda Di Fagagna, 2008) (**Figura 9**). Por estos motivos podríamos considerar a la senescencia celular como una herramienta de defensa que impide la proliferación de células dañadas evitando así su propagación.

4.2.2. Características y marcadores de células senescentes

Existen diferentes características y marcadores moleculares que nos permiten identificar a las células senescentes. Entre las características que presentan las células senescentes cabe destacar: las vías de señalización que activan el arresto estable del ciclo celular, cambios morfológicos, aumento en la actividad de la enzima beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA-beta-Gal, *Senescence-Associated beta-Galactosidase*), resistencia a la apoptosis, fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP, *Senescence-Associated Secretory Phenotype*) y reorganización de la cromatina (Di Micco et al., 2021; Herranz & Gil, 2018) (**Figura 9**). Si bien no todas las células presentan todas estas características, sí que presentan alguna de ellas y nos permiten determinar si una célula es senescente y distinguirla de otros tipos celulares que están fuera del ciclo celular, como algunos tipos de células diferenciadas.

4.2.2.1. Vías de señalización que activan el arresto estable del ciclo celular

Como ya se ha descrito, la principal característica que define a la senescencia celular es el arresto estable del ciclo celular en la fase G1. En este estado la célula no avanza en el ciclo, pero se mantiene metabólicamente activa. Esta parada está controlada principalmente por dos vías de señalización: la de p53/p21 y la de p16/pRB, caracterizadas por incluir a algunos de los principales supresores tumorales descritos (**Figura 9**). Las células senescentes no responden a estímulos mitogénicos ni de factores de crecimiento, por lo que no pueden salir de este arresto y volver a entrar en el ciclo celular en condiciones ventajosas para la proliferación, esto las diferencia de las células quiescentes que presentan una parada reversible del ciclo celular. Las células diferenciadas también presentan un arresto estable del ciclo celular, como por ejemplo las neuronas o los adipocitos. Sin embargo, se ha demostrado que en condiciones estresantes como la activación oncogénica o el daño en el ADN estas células activan un programa similar al de la senescencia, diferenciando por lo tanto el estado senescente con su estado anterior de arresto estable del ciclo (Helman et al., 2016; Jurk et al., 2014; Kang et al., 2011; Minamino et al., 2009).

Por lo tanto, es normal encontrar expresados en altos niveles estos supresores tumorales en las células senescentes, siendo especialmente importante la medida de los niveles de p16 al expresarse únicamente en altos niveles en células senescentes (E et al., 1996; Serrano et al., 1997). Como consecuencia del arresto en el ciclo, las células senescentes no proliferan por lo que analizar marcadores que permiten evaluar la replicación del ADN como por ejemplo BrdU (*5-bromo.2'-deoxyuridine*) o el EdU (*5-ethynyl-2'-deoxyuridine*) o proteínas asociadas con la proliferación celular como Ki-67 o PCNA (*PCNA, proliferating cell nuclear antigen*), puede ser utilizado como marcador para estudiar el estado senescente.

4.2.2.1. Cambios morfológicos

Durante el cultivo celular la senescencia suele ir acompañada de cambios morfológicos. Generalmente, las células senescentes se caracterizan por presentar un citoplasma plano, agrandado, cargado de vacuolas y en ocasiones por presentar varios núcleos, o un aumento en el tamaño nuclear. Algunos estudios han demostrado que *in vivo* las células aumentan de tamaño durante el proceso de senescencia (BIRAN A 2017), por lo que el aumento de tamaño podría ser considerado un marcador que define a las células senescentes.

4.2.2.2. Actividad de la enzima beta-galactosidasa asociada a senescencia (SA-beta-Gal)

Uno de los marcadores más utilizados para definir el estado senescente es la actividad de la enzima SA-beta-Gal. En condiciones fisiológicas, pH 4.0- 4.5, se detecta en todos los tipos celulares. Pero en el caso de las células senescentes su detección es posible fuera de las condiciones óptimas, pH 6.0, debido al aumento de lisosomas característico de las células senescentes (Dimri et al., 1995; Kurz et al., 2000; B. Y. Lee et al., 2006) relacionado con el aumento del proceso de autofagia (A. R. J. Young et al., 2009). La tinción que permite detectar esta actividad enzimática se utiliza para la identificación de células senescentes tanto *in vitro* como *in vivo* siendo el marcador más importante y utilizado a la hora de determinar el estado senescente.

Actualmente existen otras estrategias para la detección de la actividad SA-beta-Gal como el uso de *galacton*, un sustrato quimioluminiscente (Bassaneze et al., 2008) o mediante el uso de kits de detección directa por citometría de flujo.

4.2.2.3. Resistencia a la apoptosis

Diversos estudios han demostrado que las células senescentes son resistentes a la apoptosis (Sasaki et al., 2001; E. Wang, 1995). Este hecho podría estar producido por el aumento en la expresión de proteínas antiapoptóticas de la familia BCL-2 (BCL-2, *B-Cell Lymphoma-2*) como BCL-W y BCL-XL puesto que la inhibición de algunas proteínas de esta familia induce apoptosis en algunos tipos celulares senescentes (Demaria et al., 2014; Yosef et al., 2016; Zhu et al., 2016). Por lo que, en algunos casos, la sobreexpresión de proteínas de esta familia podría utilizarse como marcador de senescencia.

4.2.2.4. Fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP)

Otra de las características estudiadas en las células senescentes es su capacidad para secretar una gran variedad de factores (Coppé et al., 2008), siendo uno de los más importantes las citoquinas inflamatorias, entre las que destacan la interleucina 6 (IL-6) y la interleucina 8 (IL-8). Además también secretan quimioquinas (CXCL1), proteasas de la matriz extracelular o factores de crecimiento, entre otros (Freund et al., 2010). La identificación de estos marcadores puede ayudar a determinar el estado senescente de una célula. Sin embargo, el SASP varía mucho dependiendo del tipo celular y además no es una característica que todas las células senescentes presenten. Independientemente de su utilidad como marcador para determinar el estado senescente de una célula, el descubrimiento del SASP es fundamental para entender el papel que pueden tener las células senescentes en diversos procesos biológicos al estar liberando factores que actúan sobre las células y el ambiente que las rodean.

Todas las características descritas anteriormente pueden ayudar a determinar el estado senescente de una célula, sin embargo, debido a la heterogeneidad del fenotipo senescente que varía según el estímulo que desencadene la senescencia y del tipo celular al que afecta, el

establecimiento de marcadores generales resulta muy difícil. Además de los citados, las células que entran en senescencia se caracterizan en muchos casos por presentar daños en el ADN, por lo que el estudio de marcadores clásicos de daño en el ADN como la deposición de γ -H2AX (Histona H2AX fosforilada en la serina 139) y la proteína de unión a p53-1 (53BP1, *p53 Binding Protein 1*) o la activación de rutas relacionadas con la respuesta al daño en el ADN como las de ATM o ATR pueden ser útiles para estudiar el estado senescente de la célula.

4.2.3. Senescencia y reprogramación celular

La senescencia celular presenta un papel dual en el proceso de reprogramación celular. Por un lado, se ha descrito que actúa como barrera intrínseca durante el proceso de reprogramación celular. La inactivación *in vitro* de supresores tumorales como el eje p53/p21 o el locus *Ink4/Arf* que codifica para p16 y p19Arf aumentan notablemente la eficiencia del proceso de reprogramación (Hong et al., 2009; Kawamura et al., 2009; Marión et al., 2009). En el caso de este último, se ha demostrado que su silenciamiento se produce de forma natural durante el proceso de reprogramación celular y además es un requisito fundamental para que el proceso se realice con éxito (H. Li et al., 2009). Estas vías juegan un papel central en la activación del programa de senescencia y esto explica que hasta la actualidad la reprogramación de células senescentes sea un proceso muy poco eficiente. Además, se ha demostrado cómo la expresión de los factores de reprogramación en cultivos primarios de fibroblastos humanos desencadena una respuesta al estrés con características de senescencia, en la que se incluye la expresión de p53, p16 y p21, el aumento en número de células positivas para la tinción SA-beta-Gal y la formación de SAHF. A este proceso se le denomina senescencia inducida por reprogramación (RIS, *Reprogramming Induced Senescence*) y se produce como consecuencia del estrés replicativo y el daño en el ADN generado por la expresión de OSKM (Banito et al., 2009).

Por otro lado, la senescencia aumenta la eficiencia de reprogramación de las células adyacentes mediante los factores del SASP secretados, al aumentar la plasticidad celular (Chiche et al., 2017; Mosteiro et al., 2016). Esto se ha demostrado en sistemas *in vivo* en los

que utilizando el ratón reprogramable e induciendo la expresión de OSKM se genera la convivencia de poblaciones celulares que responden a la expresión de los factores activando el programa de senescencia como respuesta al daño y que no se reprograman, y células que responden a la expresión de los factores reprogramándose. Se ha encontrado una correlación positiva entre el éxito de reprogramación y la inducción de senescencia. Además, se ha estudiado que la eliminación del locus *Ink4a/Arf*, en este contexto principal mediador de la entrada en senescencia, reduce notablemente la eficiencia de reprogramación. Sin embargo, la eliminación de p53, que se asocia con altos niveles de daño tisular y senescencia generalizada, provoca un aumento notable de la eficiencia de reprogramación (Mosteiro et al., 2016) (**Figura 10**). De los factores solubles generados por las células senescentes se ha identificado que el efecto positivo sobre el proceso de reprogramación celular es producido por IL6 (Mosteiro et al., 2018). La modulación de la respuesta senescente del tejido utilizando diferentes compuestos químicos permite regular en consecuencia la eficiencia del proceso de reprogramación, lo que demuestra directamente el vínculo entre senescencia y reprogramación (Chiche et al., 2017; Mosteiro et al., 2016).

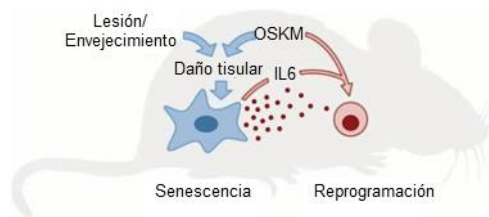


Figura 10. Senescencia celular *in vivo*. Se representa cómo la expresión de los factores de reprogramación *in vivo* genera dos poblaciones celulares diferentes, por un lado, células que se reprograman, por otro, células que responden entrando en senescencia como consecuencia del daño producido por OSKM. Las células senescentes promueven la reprogramación de las células vecinas principalmente por la liberación de IL6. Del mismo modo, la senescencia generada por lesión o envejecimiento favorece la reprogramación celular. (Imagen modificada de Mosteiro et al., 2016. Con el permiso de The American Association for the Advancement of Science)

También se ha demostrado el efecto paracrino positivo de la senescencia sobre el proceso de reprogramación celular en sistemas *in vitro*. El tratamiento de MEFs durante el proceso de reprogramación celular con medios condicionados procedentes de células a las que se le ha inducido senescencia por daño en el ADN con radiación gamma, aumenta la eficiencia del proceso de reprogramación. Si las células productoras de los medios condicionados son deficientes en la entrada en senescencia, por la eliminación del locus *Ink4a/Arf*, este mejora no se produce (Alcaraz., 2020).

4.3. APOPTOSIS

4.3.1. Causas y funciones de la apoptosis

La apoptosis es un tipo de muerte celular programada. A diferencia de otros tipos de muerte celular, como la necrosis, la apoptosis es un proceso activo y altamente regulado que se produce en los organismos multicelulares (J. F.R. Kerr et al., 1972). Del mismo modo que la senescencia, la apoptosis juega un papel fundamental a la hora de limitar la proliferación de células dañadas (John F.R. Kerr, 2002). En condiciones normales la célula presenta una batería de herramientas para reparar el daño sufrido. Si este es irreparable, la célula entrará en senescencia o apoptosis evitando así su propagación y retirándola del ciclo celular.

El proceso de apoptosis está altamente regulado y se corresponde con una secuencia de eventos ordenados que tienen como objetivo eliminar a la célula dañada sin afectar a las células que la rodean. Para ello, la célula sufre una serie de modificaciones: se retrae y se aísla, adquiere morfología redondeada, se produce la condensación del núcleo y su fragmentación (J. F.R. Kerr et al., 1972; Robertson et al., 1978; Wyllie et al., 1980), se hidroliza y fragmenta el ADN nuclear, se produce una proteólisis masiva y se degrada el citoesqueleto (Lüthi & Martin, 2007), se degradan diversos orgánulos como las mitocondrias, el retículo endoplasmático o el Golgi (Frank et al., 2001; J. D. Lane et al., 2002) y se forman invaginaciones de la membrana plasmática que cuando se separan completamente formarán los denominados cuerpos apoptóticos, que se corresponden con fracciones de célula rodeadas por la membrana y caracterizados por presentar fosfatidilserina

exteriorizada. Estos cuerpos apoptóticos serán identificados y eliminados por los macrófagos en un proceso denominado eferocitosis (Levine, 1997), lo que permite el reciclaje de las moléculas almacenadas (J. F.R. Kerr et al., 1972; Nicholson, 1999; Wyllie et al., 1980).

Se ha descrito la importancia de la apoptosis en diversos procesos biológicos como: el mantenimiento de la homeostasis tisular normal como herramienta para renovar las células, la regeneración de tejidos tras daño (Gurtner et al., 2008) o durante el desarrollo, en este caso, por ejemplo, en el sistema nervioso y en el inmune, la sobreproducción inicial de células es seguida por la entrada en apoptosis de aquellas células que no logran establecer conexiones sinápticas funcionales o especificidades antigénicas eficientes respectivamente (Nijhawan et al., 2000; Opferman & Korsmeyer, 2003). La apoptosis también juega un papel importante en la respuesta al daño en el ADN inducida por diversos factores como la hipoxia, algunos agentes químicos o la expresión de oncogenes como Ras o Myc que activan al supresor tumoral p53 promoviendo la muerte celular (Levine, 1997; Miyashita et al., 1994). Además, se ha demostrado cómo en varios tipos de cáncer, como por ejemplo en algunos linfomas, las células presentan sobreexpresadas proteínas antiapoptóticas e inhibidas proteínas proapoptóticas, lo que demuestra el papel importante de este proceso como mecanismo de supresión tumoral (Soengas et al., 2001; J. Y. Zhang, 2002).

La apoptosis celular puede ser causada por diversos estímulos tanto exógenos, como el daño producido por radiación o infecciones víricas (Orlova-Fink et al., 2017), como endógenos, como por ejemplo el daño causado en el ADN por la hiperproliferación celular.

4.3.2. Principales vías implicadas en la apoptosis

La apoptosis es un proceso altamente regulado por lo que en su activación participan muchas proteínas implicadas en cascadas de señalización. Actualmente se conocen tres vías de señalización, que permiten la activación de la apoptosis en la célula: la ruta intrínseca, la ruta extrínseca y la ruta dependiente de la granzima B. (Creagh et al., 2003). Independientemente de la ruta que se utilice para la activación

del proceso, las dianas finales serán las caspasas, responsables de desencadenar la mayoría de los eventos producidos durante el proceso de apoptosis celular. Las caspasas son una familia de cisteinil-proteasas que presentan especificidad primaria por el ácido aspartámico (Cohen, 1997; Earnshaw et al., 1999), están presentes en células sanas como enzimas precursoras e inactivas mostrando poca o ninguna actividad y se subdividen en dos grupos: por un lado están las caspasas iniciadoras que se pueden autoactivar y forman parte de la transmisión de la señal apoptótica, y las efectoras, que necesitan ser activadas por las caspasas iniciadoras u otras proteínas y serán las responsables de desencadenar la mayoría de eventos que se llevan a cabo durante la apoptosis (Creagh et al., 2003; Nicholson, 1999; Stennicke et al., 1998; Stennicke & Salvesen, 1998).

Describiremos brevemente las rutas citadas para poder identificar marcadores característicos propios de las células apoptóticas. La vía extrínseca se inicia con la unión de ligandos como Fas o el factor de necrosis tumoral- α (TNF α , *Tumour Necrosis Factor α*) a receptores de muerte transmembrana. Esta unión con el receptor provoca el reclutamiento de proteínas adaptadoras como la proteína del dominio de muerte asociada a Fas (FADD, *Fas-Associated Death Domain protein*) que favorece el reclutamiento de moléculas de caspasa 8, una caspasa iniciadora, que se activa y a su vez activa proteolíticamente a las caspasas efectoras 3 y 7 desencadenando el proceso de muerte celular (Ashkenazi & Dixit, 1998; Muzio et al., 1996; Varfolomeev et al., 1998).

La vía intrínseca está relacionada con la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. Las proteínas de la familia Bcl-2 son cruciales en la regulación de este proceso y por lo tanto en la regulación de la apoptosis. Por un lado, miembros de la subfamilia de las proteínas BH3, como Puma, Bid o Bad favorecen la permeabilidad mitocondrial al promover el ensamblaje de canales formados por las proteínas de la subfamilia Bax: Bak y Bax, mientras que los miembros de la subfamilia Bcl-2 como Bcl-2 o Bcl-XL inhiben a las proteínas de la subfamilia BH3. En condiciones estresantes para la célula, la actividad de las proteínas proapoptóticas de la familia superará a las de las antiapoptóticas. Como resultado aumentará la permeabilidad de la

membrana mitocondrial externa y se liberará citocromo c de la mitocondria al citosol. El citocromo c favorece el reclutamiento del factor activador de proteasa apoptótica (APAF1, *Apoptotic Protease Activating Factor-1*) y otras proteínas que formarán el apoptosoma. Una vez formado, el apoptosoma recluta moléculas de caspasa 9 y las activa. La caspasa 9 activa, a su vez, activará a las caspasas efectoras 3 y 7 (Adrain et al., 1999; DR & JC, 1998; Hakem et al., 1998; Van Loo et al., 2002).

Finalmente, la ruta dependiente de la granzima B implica la transferencia de esta proteasa por parte de los linfocitos T citotóxicos (CTL) o de los Natural Killers (NK) a la célula diana (Froelich et al., 1998). La granzima B se asemeja a las caspasas por ser una proteasa que presenta afinidad por residuos de ácido aspartámico. Además, se ha identificado su capacidad para activar a las caspasas efectoras 3 y 7 (Darmon et al., 1996; Martin et al., 1996; Van De Craen et al., 1997), así como a algunos miembros de la subfamilia apoptótica BH3 como Bid (Pinkoski et al., 2001), por lo que esta vía se solapa también con la intrínseca.

4.3.3. Apoptosis y reprogramación celular

Como indicamos previamente, la apoptosis juega un papel importante en procesos como la supresión tumoral y en el correcto el mantenimiento de la estabilidad genómica celular, al eliminar aquellas células que se encuentran dañadas. Durante el proceso de reprogramación celular se ha demostrado que ambos puntos son determinantes y que algunos de los supresores tumorales que desempeñan funciones importantes en estos procesos representan una barrera para el proceso de reprogramación celular.

El papel de la apoptosis durante el proceso de reprogramación celular no se ha estudiado en profundidad. Sin embargo, existen algunos estudios que indican que la inactivación de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 o la sobreexpresión de proteínas proapoptóticas como Bax aumenta la eficiencia del proceso de reprogramación celular al bloquear la entrada en apoptosis mediada por p53 de células con daño en el ADN (Kawamura et al., 2009; Marión et al., 2009). Esto demuestra que la apoptosis, activada por supresores tumorales como p53 para evitar la

propagación de células dañadas y prevenir así la inestabilidad, supone una barrera durante el proceso de reprogramación celular.

Por lo tanto, senescencia y apoptosis son dos programas distintos, pero con un objetivo común; retirar del ciclo celular de forma permanente células dañadas irreversiblemente para evitar su propagación. Los mecanismos que determinan que la célula entre en un estado u otro se desconocen.

OBJETIVOS

La estrategia de reprogramación basada en el uso de factores definidos, desarrollada por Takahashi y Yamanaka en el año 2006, ha supuesto una revolución en el campo de la reprogramación celular. En los últimos años han aumentado notablemente los tipos celulares reprogramados con éxito. Sin embargo, la reprogramación de células tumorales sigue siendo un proceso muy poco eficiente.

Los procesos de reprogramación y transformación celular comparten barreras y mecanismos comunes, por lo que la dificultad que presentan las células tumorales para ser reprogramadas es indicativa de la existencia de barreras intrínsecas dentro de estos tipos celulares.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado la imposibilidad de reprogramar por completo exitosamente células transformadas. Al mismo tiempo, han puesto de relieve que la expresión de factores de reprogramación afecta negativamente a las células tumorales. Por este motivo nos planteamos estudiar el efecto de la expresión de los factores de reprogramación en células transformadas.

Los objetivos específicos del proyecto de tesis han sido:

1. Estudiar la reprogramación en células transformadas.
 - 1.1. Analizar el proceso de reprogramación de células transformadas.
 - 1.2. Caracterizar el efecto de la expresión de los factores de reprogramación en células transformadas.
 - 1.3. Caracterizar el efecto de la expresión individual de los factores de reprogramación en células transformadas.
2. Estudiar el efecto de la expresión de los factores de reprogramación celular sobre la progresión tumoral *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales de experimentación

Todos los procedimientos experimentales en los que se han utilizado animales 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. Los procedimientos se realizaron bajo la autorización 15010/17/001, de la que es investigador responsable Manuel Collado Rodríguez según el actual y vigente RD 53/2013. Los procedimientos experimentales fueron realizados por Manuel Collado, capacitado para las funciones B y C.

1.1. CONDICIONES DE ESTABULACIÓN

Los animales de experimentación utilizados se mantuvieron estabulados en salas SPF (*Specific Pathogen Free*) del CEBEGA (Centro de biomedicina experimental de la USC) con número de registro: ES150780292901, en condiciones controladas de fotoperíodo (12 horas de luz/12 horas de oscuridad) y temperatura (20-24°C).

1.2. RATÓN NMRI-FOXN1^{NU/UN}

En los ensayos de progresión tumoral por inyección subcutánea utilizamos ratones “*nude*”, caracterizados por presentar una mutación autosómica recesiva en el cromosoma 11 en el locus *Foxn1* (*Forkhead box N1*) que causa aplasia en el timo y provoca una inmunodeficiencia por falta de células T. Estos ratones se caracterizan también por presentar defectos de queratinización en los folículos pilosos y la epidermis, lo que provoca la ausencia de pelo (*nude*). Para nuestros experimentos utilizamos 12 machos de 8 semanas suministrados por los Laboratorios Janvier.

1.3. RATÓN REPROGRAMABLE i4F

El modelo de ratón transgénico reprogramable utilizado fue la línea transgénica i4F-B (Abad et al., 2013). Este modelo se generó en ratones con un fondo genético C57BL/6 y se caracteriza por portar un activador transcripcional inducible por tetraciclina (rtTA) en el locus *Rosa26* y

un vector lentiviral que contiene un casete policistrónico inducible por tetraciclina en el intrón del gen *Pparg* y que codifica para los cuatro factores de reprogramación (OSKM: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*). Este sistema permite que en presencia de doxiciclina el rtTA se una al promotor del casete policistrónico y se expresen los factores de reprogramación en los diferentes tejidos y órganos del animal.

1.4. RATÓN KRASV12-KI

El modelo de ratón transgénico utilizado para la activación genética de tumores en pulmón fue el ratón KrasV12-KI (Kras) (Guerra et al., 2003). Este modelo se generó en ratones con fondo genético C57BL/6 y se caracteriza por portar un alelo transgénico, KrasV12-IRES- β -geo, dentro del locus endógeno de Kras que codifica para una forma activa de Kras, KrasV12. El alelo transgénico presenta en el primer intrón una señal de parada transcripcional flanqueada por puntos de recombinación LoxP, reconocidos por la recombinasa Cre, por lo que el tratamiento con esta recombinasa provoca el corte en este punto y la escisión de la señal de parada transcripcional permitiendo la expresión del alelo transgénico KrasV12.

2. Protocolos de experimentación animal

2.1. TRATAMIENTO CON DOXICICLINA EN AGUA DE BEBIDA

El tratamiento sistémico con doxiciclina *in vivo* se suministró mediante la dilución en agua de bebida. La concentración de doxiciclina (Fagron Ibérica) fue de 1 mg/mL suplementado con sacarosa (Sigma-Aldrich) al 7,5%. El tratamiento se mantuvo protegido de la luz para evitar la fotodegradación y se renovó cada 2 días durante los tiempos de tratamiento que se especifican en cada experimento.

2.2. INYECCIÓN SUBCUTÁNEA DE CÉLULAS A549

Para estudiar la formación de tumores subcutáneos a partir de las líneas de A549 con luciferasa, que portan o no la construcción con los factores

de reprogramación, se utilizaron ratones *nude*. Se realizaron 4 inyecciones por ratón, dos en cada flanco y un total de 12 machos de 8 semanas de edad. En cada una de ellas se inyectaron 2×10^6 células en un volumen de 200 μL de DMEN completo utilizando jeringas de 25G. Para anestésiar a los ratones se utilizaron equipos de anestesia inhalatoria por isofluorano (Esteve). La progresión tumoral se midió dos veces por semana utilizando el IVIS.

2.3. INYECCIÓN EN VENA LATERAL DE COLA DE CÉLULAS CML57

Para el modelo ortotópico de cáncer de pulmón se utilizaron hembras de la cepa C57/BL6 de 8 semanas de edad. El día antes de la inyección de las células los ratones se irradiaron con 4 Gray, se inyectaron 2×10^5 células Cml57 con una construcción que expresa luciferasa, coinfectada con el vector que porta los factores de reprogramación o el control con el rtTA en un volumen de 200 μL utilizando jeringas de 25G. La doxiciclina se suministró dos días antes de la inyección de las células y se renovó cada dos días. Las medidas de la progresión tumoral se realizaron dos veces por semana mediante IVIS.

2.4. ADMINISTRACIÓN INTRATRAQUEAL DE AD-CRE

Los ratones Kras y Kras/i4F se trataron por vía intratraqueal con partículas adenovirales (Ad5CMVFlpo, VVC-U producidas en las instalaciones centrales de vectores virales de Iowa-530) en una cantidad de $2,5 \times 10^7$ *pfu* que expresan la recombinasa CRE para permitir la expresión de KrasV12, a las 8 semanas de edad. Tras 6 meses desde la administración de los adenovirus, los ratones fueron tratados con doxiciclina en agua de bebida 1 mg/mL (Sigma-Aldrich) y azúcar al 7,5% durante 1 semana y renovada cada 2 días, seguido por 3 semanas de descanso con agua normal. Este ciclo se repitió por completo 2 veces, al finalizar la semana correspondiente al tercer tratamiento con doxiciclina los ratones fueron sacrificados y se analizó la formación de tumores en ratones Kras e i4F/Kras.

2.5. MEDIDA DE LA PROGRESIÓN TUMORAL POR IVIS

La señal de bioluminiscencia se monitorizó 2 veces por semana mediante el uso del *IVIS Spectrum In Vivo Imaging System*

(PerkinElmer), 10 minutos después de la inyección de 200 μ L/ ratón de 15 mg/mL de D-Luciferina (PerkinElmer) disuelta en PBS. El tiempo de exposición osciló entre los 30 segundos y los 3 minutos para garantizar el ajuste óptimo de detección de fluorescencia con el *software Living Image Software V4.5.2* (PerkinElmer), con el que también se cuantificaron los valores de fluorescencia emitida. En los experimentos se incluyeron 2 ratones inyectados con PBS en lugar de células para determinar una señal de bioluminiscencia basal.

3. Cultivos celulares

3.1. CULTIVO PRIMARIO DE MEFs WT Y MEFs p53-NULL

Para la obtención de los MEFs *wt* (*wild type*) y *p53-null*, se extrajeron los embriones de una hembra de ratón preñada, a los 13,5 días de gestación. Se sacrificó al animal por dislocación cervical y se extrajo el útero, que alberga a los embriones, los cuales se mantuvieron en PBS frío (*phosphate-buffered saline*) (Sigma-Aldrich) con un 1% de Penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich). Se extrajeron los embriones del útero, se les eliminó la cabeza y las vísceras y se lavaron en PBS. Acto seguido se disgregó el cuerpo del embrión mediante el uso de un bisturí, se añadió 1,5 mL de tripsina-EDTA 1x (Sigma) sobre el embrión y se guardó en el incubador a 37°C durante 10 minutos. Tras esta incubación se homogeniza con una pipeta de 1 mL para facilitar la disociación del tejido y se incuba durante otros 10 minutos a 37°C. Una vez tripsinizados, se resuspendieron en medio de cultivo y se sembraron en placas de 100 mm (Corning). Al día siguiente se realizaron lavados con PBS para eliminar los restos de tejido que pudiesen quedar y se añadió medio de cultivo nuevo. Cuando las células alcanzaron la confluencia, se tripsinizaron y se pasaron a placas de 150 mm (Corning). Una vez confluentes se congelaron en alícuotas de 4×10^6 células utilizando medio de congelación, FBS al 10% DMSO (Dimetilsulfóxido, Sigma-Aldrich), y se mantuvieron en nitrógeno líquido.

En ambos casos las células se mantuvieron en medio de fibroblasto: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con alta concentración de glucosa (4500 mg/L) (Sigma-Aldrich), 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Sigma-Aldrich), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich), 1% glutamina (Sigma-Aldrich). Las células se mantuvieron en el incubador a 37°C y con una atmósfera del 5% de CO₂.

3.2. LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares empleadas fueron: HEK293T (*Human Embryonic Kidney 293T*), 3T3 (fibroblastos inmortalizados por pases seriados), A549 (*Human lung adenocarcinoma*), Cml75 (adenocarcinoma de ratón), fibrosarcoma de ratón y ESC (*Embryonic Stem cells*).

Todas las líneas celulares utilizadas, a excepción de ESC, se mantuvieron en medio de fibroblasto: DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) con alta concentración de glucosa (4500 mg/L) (Sigma-Aldrich), 10% FBS (Sigma-Aldrich), 1% penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich), 1% glutamina (Sigma-Aldrich). En el caso de las ESC, las células se sembraron sobre *feeders* y se utilizó medio de iPSCs/ESCs, compuesto por: DMEM (Sigma) suplementado con 15% KSR (*Knockout Serum Replacement*) (Life technologies), 1% Penicilina/Estreptomicina (Sigma), 1% Glutamina (Sigma), 1x aminoácidos no esenciales (Sigma), 0,1 mM 2-mercaptoetanol (Life Technologies) y 1000 U/mL de LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) (Millipore). Todas las líneas se mantuvieron en el incubador a 37°C y con una atmósfera del 5% de CO₂.

Para la congelación de las líneas celulares, a excepción de las ESC, se utilizó FBS al 10% de DMSO (Sigma-Aldrich). En el caso de las ESC se empleó medio de iPSCs/ESCs suplementado con un 20% de FBS y un 10% de DMSO. Para su congelación las células se mantuvieron en nitrógeno líquido.

3.3. PREPARACIÓN DE FEEDERS

Los *feeders*, utilizados para el cultivo de las ESC, se prepararon a partir de células 3T3. Para ello, las células fueron inactivadas mitóticamente con Mitomicina C (Inibsa) a una concentración de 10 µg/mL durante 3 horas. Tras el tratamiento, las células se lavaron con PBS para eliminar

los restos de Mitomicina C, se tripsinizaron y se repartieron en alícuotas de 3×10^6 células para su congelación. Cada vial será utilizado para una placa de 100 mm previamente recubierta con gelatina (Sigma-Aldrich) al 0,1% en agua destilada durante 20 minutos a temperatura ambiente. Una vez gelatinizadas las placas, se sembraron los *feeders* con medio de fibroblasto y tras 24 horas, para permitir que estos se adhirieran a la placa, se sembraron las ESC.

3.4. TRATAMIENTOS CELULARES

3.4.1. Doxiciolina

Análogo estructural de la tetraciclina, empleado a $1 \mu\text{g/mL}$ (Sigma-Aldrich) y renovado del medio de cultivo cada 2 días durante el tratamiento, indicado en cada caso. Lo utilizamos como inductor en los sistemas regulados por el transactivador reverso dependiente de tetraciclina (rtTA): pInducer20-HrasV12, utilizado en la transformación de MEFs *p53-null*, Tet-O-OSKM y FUW Oct4/Sox2/Klf4 y Myc utilizados para la expresión conjunta e individual de los factores de reprogramación.

3.4.2. Doxorubicina

Agente quimioterápico que induce roturas de cadena doble en el ADN, provocando una respuesta al daño celular que produce la activación de p53. Lo utilizamos a una concentración de $0,5 \mu\text{g/mL}$ (TEDEC) durante 8 horas en MEFs *wt* y MEFs *p53-null* transformados para comprobar la expresión de p53.

3.4.3. Inhibidor de caspasas

Para inhibir el proceso de apoptosis utilizamos el inhibidor Z-VAD-(Ome)-FMK (MedChem) a una concentración de $20 \mu\text{M}$, el inhibidor ser renovó cada 2 días durante todo el tratamiento.

4. Vectores plasmídicos

4.1. MICROORGANISMOS EMPLEADOS

Los microorganismos empleados para amplificar el ADN plasmídico fueron bacterias *E. coli* competentes de la cepa DH5 α para los vectores retrovirales y bacterias *E. coli* de la cepa Stb13 para los vectores lentivirales.

4.2. MEDIOS DE CULTIVO DE BACTERIAS

4.2.1. Medio líquido

Para el crecimiento y selección de las cepas de *E. coli* se utilizó medio LB (Luria-Broth), compuesto por: triptona 1% (Becton Dickinson, BD), NaCl 0,5% (Sigma-Aldrich) y extracto de levadura 0,5% (BD) disuelto en agua destilada. Para la selección con antibiótico el medio se suplementó con Ampicilina (Sigma-Aldrich) a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.2. Medio sólido

Para el crecimiento en placa, se utilizaron placas con medio LB al que se le añade 1,5% de LB Agar (Sigma-Aldrich) para que gelifique formando un medio sólido. Para la selección con antibiótico se suplementó con Ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$.

4.3. OBTENCIÓN DEL ADN PLASMÍDICO

La extracción del ADN plasmídico a partir de los cultivos bacterianos se realizó utilizando el kit comercial *Genopure Plasmid Midi* (Roche) para hacer *Midipreps* a partir de 250 mL de cultivo bacteriano crecido durante 18 horas, o, en el caso de que necesitemos extraer grandes cantidades de plásmido, se utilizó el kit *QIAfilterTM Plasmid Maxi* para hacer *Maxipreps* a partir de 500 mL de cultivo bacteriano crecido durante 18 horas. En ambos casos se siguieron las instrucciones del fabricante.

Para la cuantificación del ADN plasmídico se utilizó el *Nanodrop 2000c Spectrophotometer* (Thermo Scientific) tomando como

referencia la relación de absorbancia a 260 nm/280 nm alrededor de 1.8 como indicador de ADN de alta pureza.

4.4. PLÁSMIDOS UTILIZADOS

En la siguiente tabla se detallan los plásmidos utilizados en los experimentos:

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 (Carlson SM et al., 2011)
FUGW	Addgene #14883 (Lois et al., 2002)
FUW-M2rtTA	Addgene #20342 (Hockemeyer et al., 2008)
Tet-O-FUW-OSKM	Addgene #20321 (Carey et al., 2009)
pInducer20-HrasV12	(Alexander et al., 2013)
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)
LT3GEPIR-shp21-h	Cedido por el Dr Scott Loew (MSKCC)
TetO-FUW OCT4	Addgene #20323
TetO-FUW Sox2	Addgene #20326
TetO-FUW Myc	Addgene #20324
TetO-FUW Klf4	Addgene #20322

Tabla 1. Plásmidos utilizados en los experimentos

5. Transducción retroviral y lentiviral

Las particulares retrovirales y lentivirales se generaron en células HEK293T cotransfectadas con el plásmido de interés y los empaquetadores virales. En el caso de los vectores retrovirales, para células de ratón se utilizó el pCL-ECO y para células humanas se utilizaron el pCL-ECO y el pLP-VSVG, y, en el caso de los vectores lentivirales, se utilizaron el pLP1, pLP2 y pLP-VSVG tanto para células humanas como de ratón.

5.1. TRANSFECCIÓN CELULAR

Para la transfección de las HEK293T utilizamos polietilenimina (PEI) (Polysciences). El día antes de la transfección se sembraron 5×10^6 HEK293T en placas de 100 mm (Corning). Para llevar a cabo la transfección se realizaron las siguientes mezclas en dos tubos: por un lado, se mezcla el plásmido de interés con los empaquetadores retrovirales o lentivirales, en una proporción 1:1 en el caso de retrovirus en células de ratón, 1:(1:1) en el caso de retrovirus en células humanas o 1:(1:1:1) en el caso de lentivirus, y se diluyen en medio DMEN (Sigma-Aldrich) sin suplementar. El tamaño de placa utilizado para las transfecciones es de 100 mm y se emplean 5 μg totales de ADN en un volumen de 250 μL . Por otro, se mezcla el PEI (1 mg/mL), con una relación 1:6 (DNA: PEI), con medio DMEN (Sigma-Aldrich) sin suplementar. Para el tamaño de placa de 100 mm se utilizan 30 μL de PEI, una cantidad de ADN de 5 μg y un volumen de 250 μL .

Finalmente, se mezcla el contenido de ambos tubos, se agita utilizando un vórtex y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se añade a las placas con las HEK293T sembradas el día anterior, tras 8-16 horas se lavan las células con PBS y se les cambia el medio por medio fresco.

5.2. TRANSDUCCIÓN CELULAR

Tras 36 horas desde la transfección, el medio con las partículas virales fue recogido y filtrado utilizando jeringas de 20 mL (BD) y filtros de 0,45 μm (Jet Biofil) para evitar la contaminación con restos celulares de las HEK293T. Sobre este medio filtrado se añadió *Polybrene*

(*Hexadimethrine bromide*) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se utilizó para infectar las células diana, sembradas a un nivel subconfluyente el día antes, mientras que a las HEK293T se les añadió medio fresco. Este proceso se repite 3 veces en ciclos de 12-16 horas, una vez finalizadas las 3 rondas de infección a las células diana se les cambia el medio por medio fresco y tras 12 horas de reposo se da por concluida la transducción.

6. Análisis de la expresión de ARN

6.1. EXTRACCIÓN DE ARN

Para analizar la expresión génica a nivel de ARN, extraemos el ARN total a partir de cultivos celulares o tejido utilizando el *Kit NucleoSpin® RNA* (Macherey-Nagel), siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso del ARN extraído a partir de tejido, se utilizó previamente el *TissueLyser II* (Qiagen) durante 3 minutos a 30 Hz en tubos de plástico con cierre de seguridad de 2 mL (Eppendorf) con una bola de acero inoxidable para disgregar el tejido. La cuantificación del ARN se realizó utilizando el *Nanodrop 2000* (Thermo Scientific) y tomando como referencia la relación de absorbancia entre 260 nm y 280 nm para determinar la pureza del ARN, considerando una relación cercana a 2 como ARN puro.

6.2. RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARN

Tras la extracción y cuantificación de ARN se realiza la reversotranscripción para convertirlo en ADN complementario. Para ello, utilizamos el *Kit High-Capacity cDNA ReverseTranscription* (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante a partir de 2 μg de ARN y basado en el uso de la enzima *MultiScribe™ Reverse Transcriptase*. El termociclador utilizado para la reversotranscripción fue el *MultiGene™ OptiMax* (Labnet).

6.3. qRT-PCR

Para la PCR cuantitativa (qRT-PCR) se utilizó el reactivo *NZYSpeedy qPCR Green Master Mix (2X)*, *ROX* (NZYTech) y el termociclador *AriaMx Real-Time PCR systems* (Agilent Technologies) utilizando el siguiente programa (**Tabla 2**):

	<i>Hot start</i>	<i>Amplificación (x40)</i>			<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''

Tabla 2: programa utilizado para la qRT-PCR

Para cada reacción se utilizaron 33 ng de ADNc, oligonucleótidos a una concentración final de 0,25 μ M, 5 μ L de Sybr y agua libre de nucleasas hasta completar el volumen final de 10 μ L por reacción. Como gen *housekeeping* se utilizó el *GAPDH* y los valores de los genes analizados se relativizaron a su nivel de expresión, se utilizaron triplicados para cada análisis. Los resultados se analizaron con el *software AriaMx 1.0* (Agilent Technologies) y los oligonucleótidos utilizados fueron adquiridos en Eurofins Genomics (**Tabla 3**).

Oligonucleótidos	Secuencia 5'-3'
GAPDH	F: TCCATGACAACCTTTGGCATCGTGG R: GTTGCTGTTGAAGTCACAGGAGAC
IL6	F: CCAGGAGCCCAGCTATGAAC R: CCCAGGGAGAAGGCAACTG
CXCL1	F: GAAAGCTTGCCTCAATCCTG R: CACCAGTGAGCTTCTCCTC
CDKN1A	F: CCTGTAAGTGTCTTGTACCCT R: GCGTTTGGAGTGGTAGAAATC
Klf4	F: CACCATGGACCCGGGCGTGGCTGCCAGAAA R: TTAGGCTGTTCTTTCCGGGGCCACGA
Oct4	F: GTTGGAGAAGGTGGAACCAA R: CCAAGGTGATCCTCTTCTGC
Sox2	F: GGTTACCTTCTCTCCACTCCAG R: TCACATGTGCGACAGGGGCA
c-Myc	F: CCTAGTGCTGCATGAGGAGAC R: CCTCATCTTCTTGCTCTTCTTCA

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados

7. Análisis de la expresión proteica

7.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Para la extracción de proteínas a partir de células en cultivo, retiramos el medio de cultivo de las células y realizamos dos lavados con PBS frío (Sigma-Aldrich), aspiramos el PBS y tripsinizamos las células con tripsina 1X (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos a 37°C en el incubador. Neutralizamos el efecto de la tripsina añadiendo el doble de volumen de medio de fibroblastos y recogemos la suspensión en un tubo *Falcon* para su centrifugación a 900 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente con la centrífuga *SL16R Centrifuge* (Thermo Scientific). Tras la centrifugación eliminamos el sobrenadante, resuspendemos el pellet de células en 1 mL de PBS y lo pasamos a un *Eppendorf* de 1,5 mL para su centrifugación a 3.000 rpm durante 5 minutos a 4 °C con la microcentrífuga 5415 r (Eppendorf).

Eliminamos el sobrenadante y resuspendemos el pellet celular en *buffer* RIPA 1X (*Radio-Immunoprecipitation Assay Buffer*) compuesto por: 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 los inhibidores de proteasas (1 mM Ortovanadato sódico, 1mM PMSF, 1mM DTT, 4 mM de NaF y 1X del cóctel de inhibidores proteicos), el volumen utilizado fue aproximadamente el doble del tamaño del pellet celular. Dejamos incubar en hielo durante 20 minutos y centrifugamos las muestras a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, recogemos el sobrenadante con las proteínas y lo transferimos a un tubo *Eppendorf* nuevo.

7.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de la proteína extraída se realizó mediante el método de Bradford (MM, 1976), utilizando el *kit DC Protein Assay* (BIO-RAD) siguiendo las instrucciones del fabricante. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro para microplacas *Epoch2* (BioTek) a 750 nm y la recta patrón de calibrado de la muestra se realizó a partir de concentraciones conocidas de BSA (BSA, *Bovine serum albumin*) (Sigma-Aldrich).

7.3. WESTERN BLOT

Una vez cuantificadas las proteínas se procede a su análisis por Western blot. Para la preparación de las muestras utilizamos 30 µg de proteína total y el tampón de carga (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.004% de azul bromofenol y 125 mM Tris-HCl pH 6.8) a una concentración de 1X en agua destilada. Las muestras se calentaron a 95 °C durante 5 minutos en un *termoblock Thermomixer Compact* (Eppendorf).

Una vez preparadas las muestras, se realiza una electroforesis para separar las proteínas en función de su tamaño siguiendo el método de Laemmli (Laemmli, 1970). Utilizamos el sistema *Mini-PROTEAN Tetra Cell* (BIO-RAD) y geles de poli(acrilamida) (solución 30%, Acrilamida/Bis 29:1, BIO-RAD). El gel concentrador se preparó al 4% (4% de acrilamida/bisacrilamida, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0,1% SDS, 0,1% APS, 0,08% TEMED en agua destilada) y el separador al 12% (12% de acrilamida/bisacrilamida, 370 mM Tris-HCl pH 8.8, 0,1% SDS, 0,075% APS, 0,04% TEMED en agua destilada). 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 (Milipore) mediante transferencia húmeda utilizando el equipo *Mini Trans-Blot Electroforetic Transfer Cell* (BIO-RAD) a 100 voltios durante 1 hora. El bloqueo de la membrana se realizó 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 temperatura ambiente. Finalmente, los anticuerpos primarios (**Tabla 4**) se incubaron ON (*overnight*) a 4°C y en agitación. Al día siguiente se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes conjugados con la enzima HRP (*Horseradish Peroxidase*) (**Tabla 5**) durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación. La inmunodetección se realizó mediante un sistema de quimioluminiscencia basado en ECL (*Enhanced chemiluminescence*) *Supersignal™ weat pico PLUS chemiluminescent substrate* (Thermo Fisher) y exposición y revelado en *ChemiDoc™ MP Imaging System* (BIO-RAD).

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Huésped	Dilución
p53 (1C12)	Cell signaling	2524	Ratón	1:1000
HRas	BD Biosciences	610001	Ratón	1:2000
Actina	MP Biomedicals	0869100	Ratón	1:5000
P-Histona H2AX (Ser139)	Cell signaling	9718	Conejo	1:1000
Klf4	Santa Cruz	sc-20691	Conejo	1:500
Oct-3/4 (H-134)	Santa Cruz	sc-9081	Conejo	1:1000
Cyclina E	Santa Cruz	sc-481	Conejo	1:1000
p-RB (Ser807/811)	Cell signaling	8516	Conejo	1:1000
RB (4H1)	Cell signaling	9309	Ratón	1:2000
b-Tubulina	Cell signaling	2146	Conejo	1:1000
p21 (12D1)	Cell signaling	2947	Conejo	1:1000

Tabla 4. Anticuerpos primarios utilizados

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 utilizados

8. Reprogramación celular

8.1. REPROGRAMACIÓN CON VECTORES LENTIVIRALES

Para los ensayos de reprogramación celular las células de adenocarcinoma de ratón, fibrosarcoma de ratón, A549, MEFs transformados y MEFs *wt* fueron transducidas con los plásmidos lentivirales Tet-O-FUW-OSKM y rtTA. Se sembraron 2×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos (Corning), se realizó la transducción lentiviral y pasadas 24 horas desde la última ronda de infección se inició la reprogramación celular. Para ello, el medio de fibroblastos se cambió por medio de iPSCs/ESCs con doxiciclina a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$, tanto el medio como la doxiciclina se cambiaron cada 2 días hasta completar los 14 días en los que se da por finalizado el proceso de reprogramación.

8.2. TINCIÓN FOSFATASA ALCALINA (AP)

Una de las características de las iPSCs y de las ESCs es que expresan altos niveles la enzima AP, por lo que la detección de esta enzima se utiliza como un marcador fundamental para identificar el estado de iPSC. Tras 14 días de reprogramación realizamos una tinción fosfatasa alcalina en las células que fueron sometidas al proceso de reprogramación con el objetivo de identificar colonias teñidas y con una morfología característica: redondeadas, con bordes bien definidos y refringentes, indicativas del éxito del proceso de reprogramación. Para la tinción, las células fueron previamente fijadas con paraformaldehído (EMS, *Electron Microscopy Sciences*) al 4% en PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas se utilizó el kit comercial *Alkaline Phosphatase Blue Membrane Substrate Solution*, que permite la detección colorimétrica de esta actividad enzimática, siguiendo las instrucciones del fabricante.

9. Ensayos de proliferación celular

9.1. PROLIFERACIÓN A TIEMPOS CORTOS

Para estudiar la capacidad proliferativa a tiempos cortos sembramos 5×10^4 MEFs transformados o A549 en pocillos de p6 (Corning). Analizaremos la capacidad proliferativa durante los 3 primeros días; T1, T2 y T3 por recuento en cámara de Neubauer (Hausser Scientific), con triplicados para cada condición y día para evaluar el crecimiento de la población celular.

9.2. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN CON EL XCELLIGENCE

El XCELLigence (Agilent) nos permite determinar una medida a tiempo real del crecimiento de nuestra población celular en cultivo. En placas de 16 pocillos, específicas del sistema, sembramos 500 células A549 con la construcción que permite la expresión de los factores de reprogramación. De los 16 pocillos sembrados a 8 se les suministró doxiciclina a una concentración de $1 \mu\text{g/mL}$ con el medio de fibroblastos y a las otras 8 no. Se realizaron medidas cada 15 minutos durante los 5 días de experimento y los datos se analizaron con la versión 1.2.1.1002 del *software* suministrado por la propia casa comercial del sistema.

9.3. ENSAYOS DE CLONOGENICIDAD

Para los ensayos de clonogenicidad sembramos 500 células A549 o MEFs transformados que expresan o no los factores de reprogramación, en pocillos de p6 (Corning) y con triplicados para cada condición. El medio y la doxiciclina, en la condición correspondiente, se renovó cada 2 días. Tras 14 días de crecimiento se da por concluido el ensayo, evaluamos el crecimiento celular y la formación de focos con una tinción cristal violeta.

9.3.1. Tinción cristal violeta

Para la tinción cristal violeta las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (EMS, *Electron Microscopy Sciences*) al 4% en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras la fijación se lava de nuevo con PBS y se incuba durante 30 minutos a temperatura

ambiente con cristal violeta (Sigma-Aldrich) al 0,05% en agua destilada. Tras la incubación, las células se lavan con agua destilada y se dejan secar durante 24 horas para su cuantificación. La cuantificación se puede hacer de dos formas: escaneando con el escáner *CanoScan LiDE 210* (Canon) la placa y contando el número de focos formados con el programa *ImageJ*, o bien, eluyendo el cristal violeta mediante el uso de ácido acético (Sigma-Aldrich) al 20% durante 5 minutos en agitación y a temperatura ambiente en cuyo caso la cuantificación se hará en un espectrofotómetro para microplacas *Epoch2* (BioTek) a 570 nm.

9.4. ENSAYO DE FORMACIÓN DE COLONIAS EN AGAR BLANDO

Con el ensayo de formación de colonias en agar blando evaluamos la capacidad de las células de crecer en ausencia de anclaje, capacidad característica de las células transformadas. Para llevar a cabo el ensayo se utilizaron pocillos de p6 en los que se preparó una base sólida de 1 mL de agar (Thermo Fisher) al 0,8% diluido en medio de fibroblastos y se dejó solidificar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Sobre la base sólida, se sembraron $2,5 \times 10^3$ células A549 en 1 mL de agar (Fisher) al 0,35% diluido en medio de fibroblastos. Se añadió medio fresco y doxiciclina a una concentración de 1 $\mu\text{g/mL}$, según la condición de expresión o no de los factores, cada 2 días durante los 14 días que duró el ensayo y la cuantificación se realizó contando el número de colonias formadas por campo utilizando un microscopio *AxioVert.A1 Microscope* (Zeiss).

10. Detección de la actividad SA-beta-Gal

10.1. TINCIÓN HISTOQUÍMICA SA-BETA-GAL

Para la tinción histoquímica de la actividad SA-beta-Gal las células se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído (EMS) al 2% y glutaraldehído (Fisher) al 0,2% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Para eliminar los restos de la fijación se

realizaron 3 lavados con PBS y se incubó durante 12-16 horas a 37°C (sin CO₂) con la solución de tinción, compuesta por: 40 mM ácido cítrico/fosfato sódico pH 6.0, 5 mM K₃Fe [CN]₆, 5 mM K₄Fe [CN]₆, 150 mM NaCl y 2 mM MgCl₂, 1 mg/mL de 5-bromo-4-cloro-3-indolyl β-D-galactoside (X-Gal) (Fisher) disuelto en agua. Tras la incubación con la solución de tinción, las células se lavaron con PBS y se fotografiaron utilizando un microscopio *AxioVert.A1 Microscope* (Zeiss).

10.2. GALACTÓN

Para la detección quimioluminiscente de la actividad SA-beta-Gal se utilizó el kit *Galacto-Light Plus™ beta-Galactosidase Reporter Gene Assay System* (Applied Biosystems), siguiendo las instrucciones del fabricante a excepción del tampón de ácido cítrico/fosfato de sodio que se utilizó a pH 6.0, puesto que se adecuaba mejor para la detección de esta enzima en las células A549 analizadas.

Para cada reacción se incubaron 5 µl de proteínas con 70 µl de buffer de reacción (dilución 1:100 de *Tropix Galacton-Plus* en buffer ácido cítrico/fosfato sódico 40mM a pH 6.0) en placas de 96 pocillos con fondo opaco (Corning) durante 2 horas, en oscuridad y a temperatura ambiente. Tras la incubación, se añadieron 100 µl de acelerador (*TropixAccelerator II*) y la señal se midió durante 1 segundo/pocillo utilizando un luminómetro *Mithras LB 940* (Berthold Technologies). Para cada condición se analizaron 10 muestras y los valores de luminiscencia obtenidos se normalizaron a la concentración de proteínas de cada extracto, previamente cuantificados con el kit *DC Protein Assay* (BIO-RAD) como explicamos en apartados anteriores.

10.3. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD SA-BETA-GAL POR FACS

Para la detección de la actividad SA-beta-Gal por citometría de flujo utilizamos el kit *Cell Event™ Senescence Green Flow Cytometry Assay* (Fisher, referencia: C10840) siguiendo las instrucciones del fabricante. Analizamos 10 x 10³ células en cada muestra con el equipo *FACScan* (BD Biosciences). En todas las medidas se incorporó un control sin tñir para calibrar la positividad de las células.

11. Detección de marcadores de apoptosis

11.1. ANEXINA V POR FACS

En células normales, la fosfatidilserina se observa en la parte interna de la membrana plasmática, la translocación de esta proteína a la cara externa de la membrana es indicativa de apoptosis celular. La Anexina V se une a la fosfatidilserina y permite su detección, considerándose como un marcador de etapas tempranas del proceso de apoptosis.

Para la detección de fosfatidilserina utilizamos una sonda de Anexina V acoplada al fluoróforo FITC (Immunostep). Para ello, las células se tripsinizaron, se contaron para ajustar a 1×10^6 células por reacción, se lavaron con PBS, se resuspendieron en 1 mL de *binding buffer* (NaCl 10 mM, Hepes/NaOH 10 mM a pH 7,4 y CaCl₂ 2,5 mM diluído en agua destilada) con 5 μ l de la sonda y se dejaron incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Tras los 15 minutos se añadieron 400 μ l de *binding buffer* y se analizaron por citometría en menos de 1 hora para evitar la pérdida de fluorescencia acoplada a la sonda. Analizamos 10×10^3 células en cada muestra con el equipo *FACScan* (BD Biosciences). En todas las medidas se incorporó un control sin teñir para calibrar adecuadamente la positividad de las células.

11.2. CASPASA 3 CORTADA POR FACS

La caspasa 3 en su forma activa, caspasa 3 cortada, representa uno de los principales efectores del proceso de apoptosis, desencadenando procesos como la degradación y fragmentación del núcleo o la proteólisis generalizada, entre otros. Su detección en la célula es indicativa de estados avanzados del proceso de apoptosis.

Para la detección de este marcador utilizamos el *PE active caspase 3 apoptosis kit* (BD Biosciences, referencia: 550914) siguiendo las instrucciones del fabricante. Analizamos 10×10^3 células en cada muestra con el equipo *FACScan* (BD Biosciences). En todas las medidas se incorporó un control sin teñir para calibrar adecuadamente la positividad de las células y un control positivo para el marcador, en este caso células A549 tratadas con cisplatino (Sigma-Aldrich) a 10 mM durante 24 horas.

11.3. CASPASA 3 CORTADA POR Sonda FLUORESCENTE

Para la detección del marcador en las colonias formadas en agar blando tras 14 días de crecimiento, utilizamos la sonda comercial *cell EventTM caspase-3 Green detection reagent* (Invitrogen, referencia: C10423) a una concentración 2 μ M añadida directamente al medio de cultivo, en colonias que expresan o no los factores de reprogramación tras 3 días. Se realizó un seguimiento y se sacaron fotografías representativas con el microscopio *AxioVert.A1 Microscope* (Zeiss) durante las 24 horas siguientes al tratamiento con la sonda.

12. Análisis de la composición de ciclo celular

Para analizar en qué proporción de las distintas fases del ciclo celular se encontraba nuestro cultivo, realizamos una citometría de flujo tiñendo el ADN de las células con yoduro de propidio. Para ello tripsinizamos el cultivo celular, contamos para ajustar a 1×10^6 células cada reacción, lavamos con PBS frío, fijamos las células con 2 mL de metanol (Fisher) frío (-20 °C) en agitación moderada y gota a gota para evitar la formación de agregados y guardamos las células con metanol a 4°C durante 24 horas. Las células se centrifugan, se elimina el metanol, se lavan con PBS frío y se incuban con 0,5 mL de RNase (Invitrogen) 2 mg/mL y 0,5 mL de yoduro de propidio (Invitrogen) 1 mg/mL en agua destilada durante 30 minutos en oscuridad. Finalmente, analizamos 10×10^3 células en cada muestra con el equipo *FACScan* (BD Biosciences), obtendremos el perfil de ciclo en base a la cantidad de ADN de las células: 2N células en fase G1, entre 2N y 4N células en fase G2 y 4N células en fase M.

13. Ensayo con factores secretados

13.1. ENSAYOS EN *TRANSWELL*

Para el cocultivo se utilizaron *transwells* con una membrana porosa de 8 μm (Corning). Se sembraron 5×10^4 células en pocillos de p24 (Corning), que representan a las células receptoras, en nuestro caso serán A549, sobre las que colocaremos el *transwell* en el que sembraremos 4×10^4 células, que representan a las células productoras que expresan o no los factores de reprogramación dependiendo de la condición. Tras 3 días de cocultivo se tripsinizan y cuentan en cámara de Neubauer las células receptoras para ver si el cocultivo con células que expresan o no los factores de reprogramación afecta a su capacidad proliferativa.

13.2. ENSAYOS CON MEDIOS CONDICIONADOS

Para el ensayo con medios condicionados, se recogió el medio tras 48 horas de células A549 que expresan o no los factores de reprogramación, se filtró utilizando un filtro de 0,45 μm (Jet Biofil) y se trataron las células receptoras, en este caso 5×10^4 A549 sembradas en pocillos de p24. Tras 3 días de tratamiento con medios condicionados, las células receptoras se tripsinizaron y se contaron utilizando una cámara de Neubauer para ver si el tratamiento con medios condicionados procedentes de células que expresan o no los factores de reprogramación afecta a su capacidad proliferativa.

15. Análisis histológico

15.1. INCLUSIÓN EN PARAFINA

Para el análisis histológico de los tejidos, estos fueron fijados por inmersión en una solución fijadora de formalina (Panreac AppliChem) al 10% en agua destilada durante 24 horas a 4°C. Tras esta fijación, el agua de los tejidos se elimina, para ello primero se utilizan

concentraciones crecientes de alcohol hasta llegar a 100° utilizando un procesador de tejidos *Leica ASP6025* y finalmente xilol (Sigma-Aldrich), puesto que la parafina es hidrófoba y los tejidos están formados principalmente por agua. La muestra se sumerge en un molde con parafina líquida y se deja solidificar a temperatura ambiente. Los bloques de parafina se cortaron en secciones de 5 μm utilizando un microtomo de rotación *Leica RM225* con 2-3 secciones por portaobjetos y al menos 90 portaobjetos por ratón. Para las tinciones realizadas, las distintas secciones se desparafinaron y se rehidrataron mediante el tratamiento por alcoholes de gradación decreciente hasta llegar a agua.

15.2. HEMATOXILINA-EOSINA (H&E)

El análisis histológico de los cortes se realizó mediante la tinción H&E, tras su rehidratación, las secciones cortadas se tiñeron con hematoxilina (Panreac AppliChem) y eosina (Milipore).

Para la tinción se utilizaron de 8 a 12 sección de cada ratón y se escanearon los portaobjetos con el escáner Axio Z1 (Zeiss). Para realizar el recuento y clasificación de los tumores se utilizó el *software HALO V3.0.311.373* (Indica Labs). La relación entre el tumor y el área pulmonar se calculó dividiendo el área total de todas las lesiones tumorales entre el área pulmonar total. Para la comparación entre genotipos, se utilizó el portaobjetos con la relación máxima de tumor/tejido pulmonar para cada ratón.

15.3. TINCIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE OCT4 Y CASPASA 3 CORTADA.

Las tinciones inmunohistoquímicas para Oct4 y caspasa 3 cortada fueron realizadas por la unidad de histopatología del CNIO. Para su cuantificación se analizaron las regiones tumorales de cada ratón con tamaños comprendidos entre 10.000 y 30.000 células totales y mediante el uso del *software HALO (V3.0.311.373, Indica Labs)*.

16. Microscopía

Para la visualización rutinaria de las células y el recuento en cámara de Neubauer se utilizó el microscopio óptico *Primo Vert Microscope* (Zeiss). Para la adquisición de fotografías de campo claro y fluorescencia, se utilizó el microscopio *Axio Vert.A1 Microscope* (Zeiss) y el *software Zen Blue Edition* (Zeiss) para el procesado de las imágenes.

17. Análisis estadístico

La significación estadística de los datos obtenidos se analizó mediante la prueba t de *student* de dos colas: *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$; nada, no significativo. Esta prueba nos permite comprobar si las medias de dos poblaciones que siguen una distribución normal son iguales. En nuestro caso siempre comparamos si dos poblaciones, expresión o no de los factores de reprogramación, son significativamente distintas con respecto a una única variable.

RESULTADOS

1. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación en células transformadas

Durante el proceso de reprogramación celular las células sufren diversos cambios epigenéticos que afectan a la expresión génica, modificando así la identidad celular. En los últimos años se han producido grandes avances en este campo gracias al desarrollo de una estrategia de reprogramación basada en el uso de una serie de factores definidos, los factores de reprogramación (Takahashi & Yamanaka, 2006), aumentando notablemente los tipos celulares que se han podido reprogramar con éxito. Sin embargo, la reprogramación de células tumorales, pese a que comparten diversas características con las iPSCs resultantes del proceso de reprogramación, sigue siendo un proceso poco eficiente y las iPSCs obtenidas presentan una serie de limitaciones (Kim, 2020). En la misma línea, estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado la dificultad de reprogramar células tumorales. Además, durante el proceso de reprogramación observamos cómo las células se veían afectadas negativamente. Por este motivo nos planteamos estudiar cuál es el efecto de la expresión de los factores de reprogramación en células transformadas.

1.1. REPROGRAMACIÓN CELULAR DE CÉLULAS TRANSFORMADAS

Pese a los grandes avances que se han producido en los últimos años en el campo de la reprogramación celular, hasta la fecha la reprogramación de células transformadas continúa siendo un proceso ineficiente y poco estudiado.

Por este motivo, en primer, lugar intentamos reprogramar diferentes tipos celulares transformados. Para llevar a cabo la reprogramación utilizamos el vector lentiviral Tet-O-FUW-OSKM, que porta los factores de reprogramación (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*), coinfectado con el vector lentiviral FUW-M2rtTA, de modo que en presencia de doxiciclina (análogo de la tetraciclina) se produce la expresión de los factores de reprogramación. Tras 14 días de cultivo en condiciones de reprogramación se analizó la presencia de colonias de células madre con pluripotencia inducida (iPSCs, *induced pluripotent*

stem cells) positivas para la tinción fosfataza alcalina (AP, *alkaline phosphatase*). Solo se observaron colonias de iPSCs positivas para la tinción AP en el control de reprogramación constituido por MEFs *wild type* (*wt*) pero no en ninguna de las células transformadas utilizadas, en las que solo se observa, en alguna condición, rastros de tinción inespecífica, pero en ningún caso colonias de reprogramación bien definidas. (**Figura 1**).

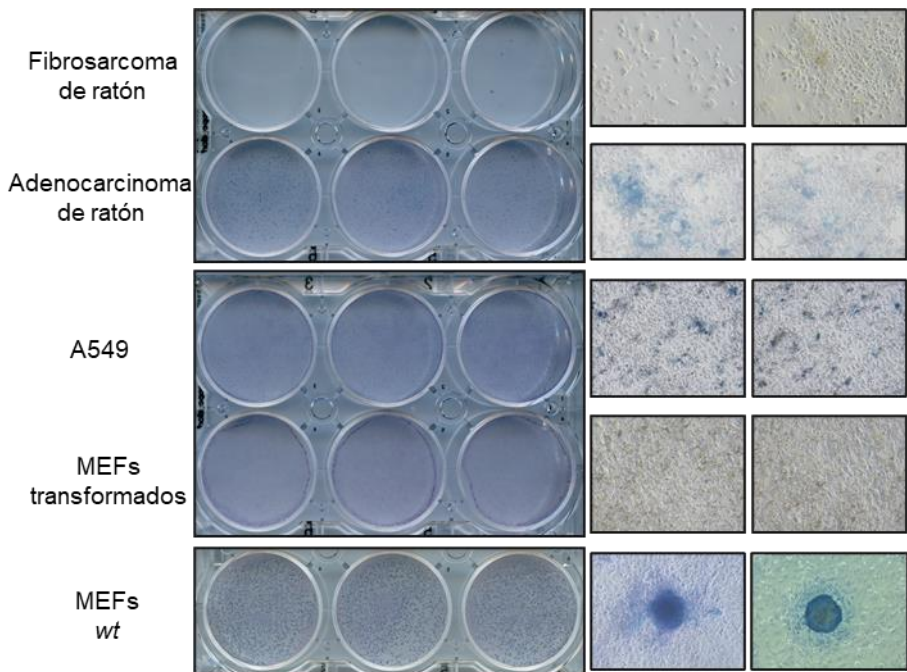


Figura 1. Reprogramación celular de células transformadas. Tinción fosfataza alcalina que tiñe colonias de reprogramación e imágenes de microscopía óptica en las que se muestran las colonias de reprogramación obtenidas.

1.2. CÉLULAS DE RATÓN

Además de la imposibilidad de reprogramación de las células transformadas observamos cómo estas se veían afectadas durante el proceso de reprogramación por la expresión de los factores al disminuir su viabilidad. Por este motivo decidimos analizar el efecto de la

expresión de los factores en las células transformadas, iniciando los ensayos en células de ratón.

1.2.1. Sistema de transformación celular en MEFs

Con el objetivo de obtener una estrategia de transformación celular controlada y un cultivo celular homogéneo utilizamos MEFs *p53-null*, caracterizados por ser deficientes para la proteína p53. Sobre estos fibroblastos introducimos el vector lentiviral pInducer20-HrasV12 que en presencia de doxiciclina permite la expresión del mutante oncogénico HrasV12, caracterizado por presentar una glicina (G) en lugar de una valina (V) en la posición 12, lo que produce que se mantenga activo de forma permanente sin posibilidad de ser desactivado (Cox & Der, 2010) y permitiendo así la transformación de estos MEFs deficientes para p53. Sobre estas células se introdujo el vector lentiviral Tet-O-FUW-OSKM que permite la expresión de los factores de reprogramación o el vector lentiviral FUGW que expresa GFP (*Green Fluorescence Protein*) como control que no afecta a la viabilidad celular (**Figura 2A**).

Analizamos por Western blot cómo los MEFs *p53-null* no expresan p53 ni siquiera cuando son tratados con un inductor de daño al ADN como la doxorubicina (que produce un aumento en la expresión de esta proteína), mientras que en el control constituido por MEFs *wt* si observamos este aumento. Además, observamos un aumento en la expresión de Hras en nuestras células cuando las comparamos con el control de MEFs *wt* (**Figura 2B**). Para testar su estado transformado, estas células se inyectaron subcutáneamente en ratones inmunodeprimidos NMRI-Foxn1 *nu/nu* (“*nude*”) observando cómo presentaban la capacidad de desarrollar tumores (**Figura 2C**).

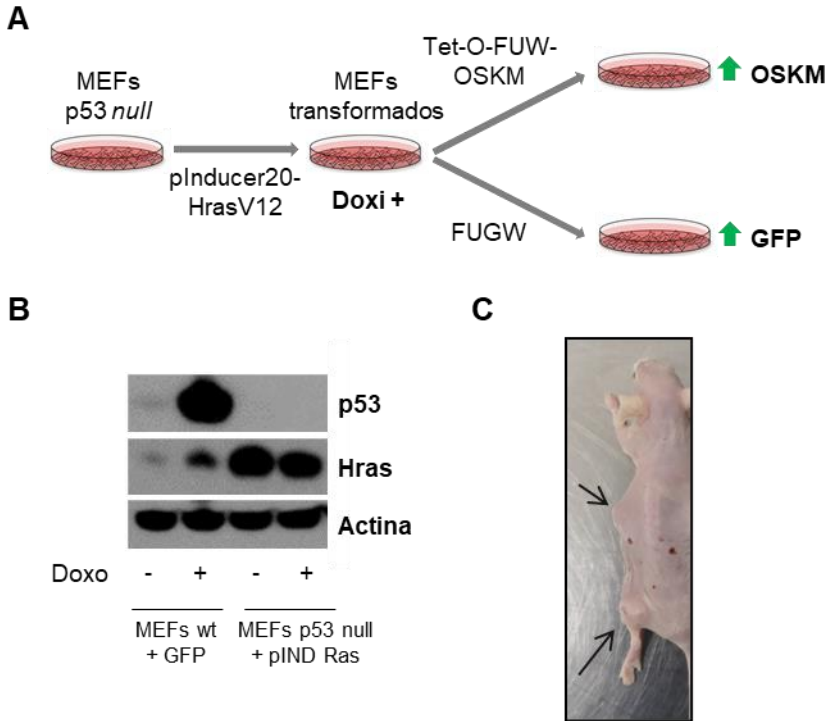


Figura 2. Sistema de transformación celular en MEFs p53 null. (A) Representación esquemática del sistema de transformación celular empleado. (B) Western blot para p53 y Hras en MEFs p53 null transformados o no y tratados o no con doxorubicina. Como control de carga utilizamos Actina. (C) Ensayo de formación de tumores por inyección subcutánea con MEFs p53 null transformados, en ratones inmunodeprimidos. Se indican con flechas los tumores formados en el ratón.

1.2.2. Efecto de la expresión de los factores sobre la capacidad proliferativa en MEFs transformados

Una vez testado el estado transformado de estas células, analizamos la capacidad proliferativa de aquellas que expresan los factores de reprogramación y la comparamos con la condición control; las mismas células, pero expresando GFP que no afecta a su capacidad proliferativa.

Tras tres días de crecimiento en placa observamos una reducción significativa de la capacidad proliferativa en las células que expresan los factores de reprogramación comparadas con el control (**Figura 3A**).

Estas diferencias se observan también a más largo plazo en los ensayos de clonogenicidad, en los cuales tras catorce días de crecimiento se realizó una tinción cristal violeta para determinar el crecimiento celular y se observó una bajada en la capacidad proliferativa en las células que expresan los factores con respecto al control (**Figura 3B**).

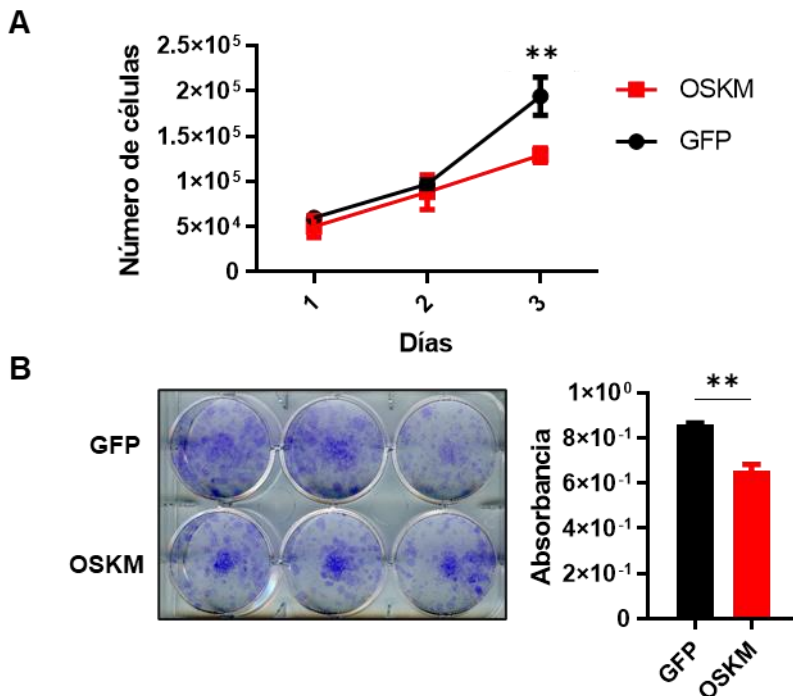


Figura 3. Efecto de los factores de reprogramación sobre la capacidad proliferativa en MEFs p53 *null* transformados. (A) Recuento de la capacidad proliferativa en MEFs p53 *null* transformados que expresan los factores de reprogramación (OSKM) y en el control (GFP) a tiempos cortos. (B) Ensayo de expansión clonal en MEFs p53 *null* transformados que expresan los factores de reprogramación (OSKM) y en el control (GFP). Placa de la tinción cristal violeta (izquierda) y cuantificación de la tinción (derecha). La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P < 0,001; ** P < 0,01; * P < 0,05.

1.3. CÉLULAS HUMANAS

Teniendo en cuenta los resultados observados en las células de ratón, decidimos estudiar el efecto de los factores de reprogramación en una línea celular tumoral estándar. Elegimos la línea de carcinoma de

pulmón humana A549 por su extendido uso en multitud de ensayos de transformación celular.

1.3.1. Efecto de la expresión combinada de los factores de reprogramación sobre la capacidad proliferativa

Para estudiar el efecto de la expresión de los factores de reprogramación en A549 introducimos el vector lentiviral Tet-O-FUW-OSKM coinfectado con el FUW-M2rtTA. Este sistema nos permite apagar o encender la expresión de los factores de reprogramación en base a la presencia o no de doxiciclina en el medio de cultivo (**Figura 4A**). Para estudiar la funcionalidad del sistema empleado analizamos por qRT-PCR los niveles de expresión total del factor de reprogramación *Klf4*, observando un gran aumento cuando añadimos doxiciclina al medio de cultivo (**Figura 4B**).

Una vez validado el sistema, estudiamos el efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre la capacidad proliferativa. Observamos cómo la expresión de los factores de reprogramación reduce la capacidad proliferativa en A549. En primer lugar, analizamos la capacidad proliferativa a tiempos cortos, observando una reducción en la capacidad proliferativa dentro de los tres primeros días en las células que expresan los factores de reprogramación (doxi +) comparado con aquellas que no los expresan y que representan nuestro control (doxi -). También observamos cómo entre el control constituido por las células que portan la construcción pero que no expresan los factores y el control de células A549 infectadas con un plásmido que expresa GFP no existen diferencias. Esto indica que el nivel basal de expresión de la construcción utilizada es marginal y no afecta a las A549, por lo que puede ser utilizado adecuadamente como control en próximos experimentos (**Figura 4C**). Además, evaluamos la capacidad proliferativa utilizando el xCELLigence, un sistema que determina el número de células en base la superficie de la placa ocupada por las mismas y observamos una reducción en la proliferación dentro de los cinco primeros días en las células que expresan los factores de reprogramación comparado con el control de células que no expresan los factores (**Figura 4D**).

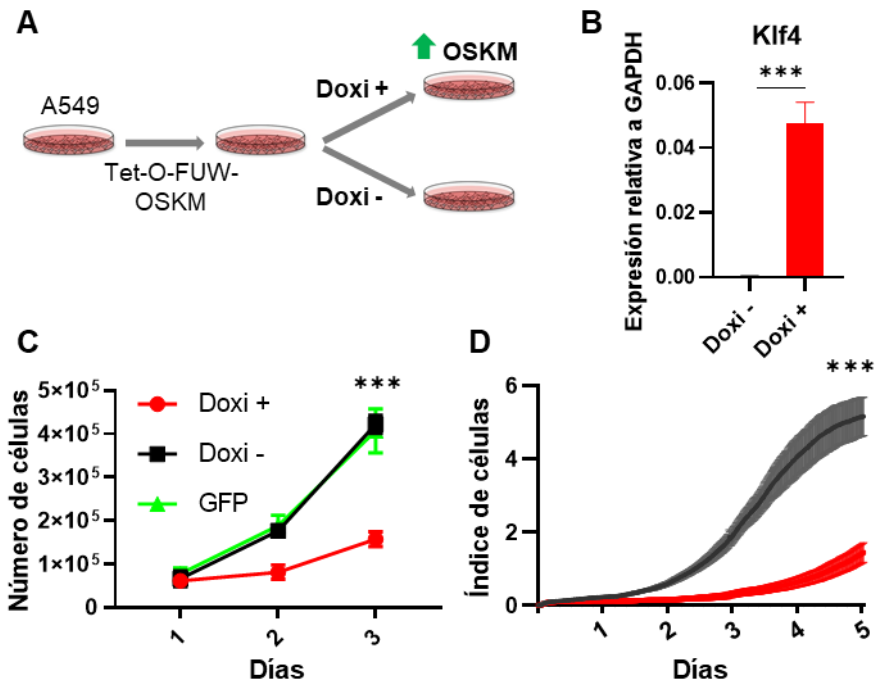


Figura 4. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre la capacidad proliferativa a tiempos cortos en células A549. (A) Representación esquemática del sistema empleado en los ensayos. (B) qRT-PCR cuantitativa para comprobar la expresión de uno de los factores de reprogramación celular (*Klf4*). (C) Análisis de la capacidad proliferativa por recuento con cámara de Neubauer en células A549 que expresan (Doxi +) o no (Doxi -) los factores de reprogramación o que expresan GFP. (D) Análisis de la capacidad proliferativa por recuento con el xCELLigence en células A549 que expresan (Doxi +) o no (Doxi -) los factores de reprogramación. La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P <0,001; ** P <0,01; * P <0,05.

También analizamos el efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre la capacidad proliferativa a tiempos más largos. Por un lado, realizamos ensayos de clonogenicidad. Tras catorce días realizamos una tinción cristal violeta y observamos una disminución en la capacidad proliferativa en las células que expresan los factores (Figura 5A). Por otro, realizamos un ensayo de formación de colonias en agar blando. Esta técnica permite evaluar la capacidad de las células para crecer en ausencia de anclaje formando colonias tridimensionales,

siendo esta una de las características generales de las células transformadas. Observamos una reducción en la capacidad de formar colonias en las A549 que expresan los factores de reprogramación comparado con el control (**Figura 5B**)

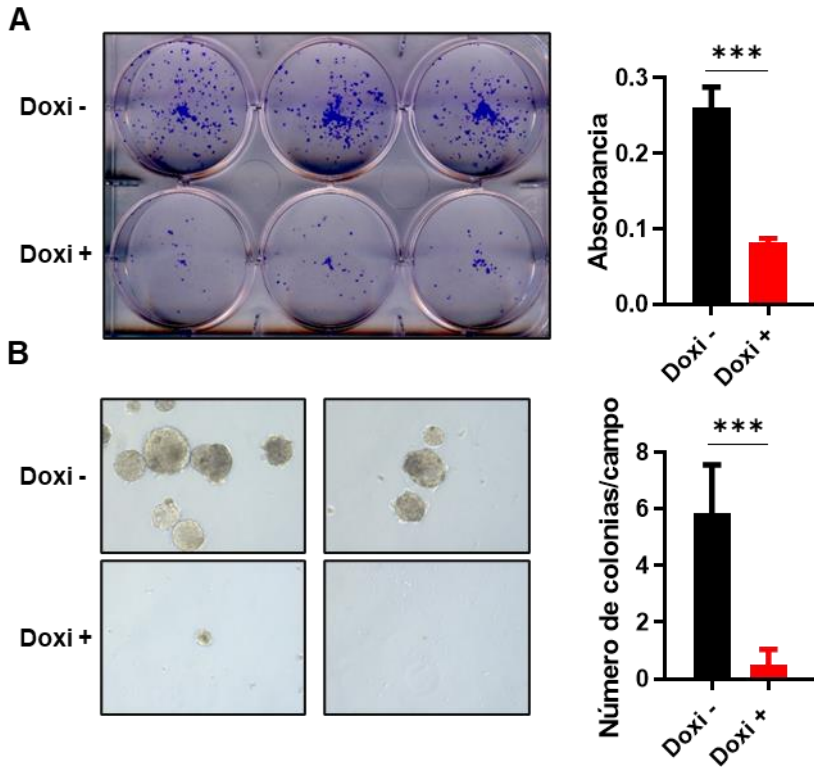


Figura 5. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre la capacidad proliferativa a tiempos largos en células A549. (A) Ensayo de expansión clonal en células A549 que expresan los factores de reprogramación (Doxi +) o no (Doxi -). Placa de la tinción cristal violeta (izquierda) y cuantificación de la tinción (derecha). **(B)** Ensayo de formación de colonias en agar blando sobre células que expresan (Doxi +) o no (Doxi -) los factores de reprogramación. Imágenes representativas con microscopía óptica (izquierda) y cuantificación del número de colonias por campo (derecha). La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P <0,001; ** P <0,01; * P <0,05.

1.3.2. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre colonias celulares ya establecidas

Hasta ahora los experimentos realizados se centraban en analizar cómo la expresión de los factores afectaba a la capacidad proliferativa de las A549. En este punto decidimos analizar si la expresión de los factores puede afectar a estructuras celulares tridimensionales ya formadas.

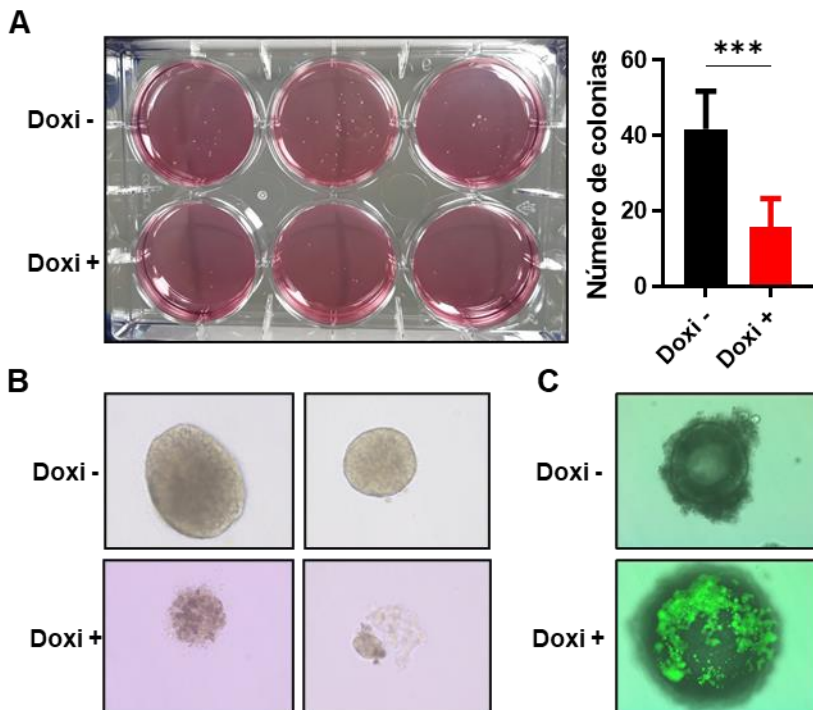


Figura 6. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre colonias ya formadas de A549. (A) Fotografía de la placa que se utilizó para el ensayo de formación de colonias en agar blando (izquierda) y cuantificación (derecha). **(B)** Imágenes representativas al microscopio óptico de las colonias de A549 tras la expresión (Doxi +) o no (Doxi -) de los factores de reprogramación. **(C)** Imágenes al microscopio de fluorescencia con el *reporter* de caspasa 3 cortada en colonias de células que expresan (Doxi +) o no (Doxi -) los factores de reprogramación. La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P <0,001; ** P <0,01; * P <0,05.

Sobre colonias de A549 formadas en agar blando indujimos o no la expresión de los factores de reprogramación. Tras siete días observamos una disminución en el número de colonias comparado con el control (**Figura 6A**). También observamos cómo la expresión de los factores afecta a la estructura y morfología normal de las colonias; estructuras redondeadas, compactas y bien definidas que se convierten en difusas e inconsistentes (**Figura 6B**). Además, detectamos la presencia de caspasa 3 cortada, una proteína que participa en el proceso de apoptosis celular, en las colonias de células que expresan los factores de reprogramación, pero no en el control (**Figura 6C**).

Estos resultados indican que la expresión de los factores de reprogramación en A549 no solo afecta a su capacidad proliferativa, sino que también es capaz de producir la destrucción de estructuras celulares ya formadas.

1.3.3. Mecanismos moleculares activados por la expresión de los factores de reprogramación en células A549

Una vez que hemos determinado el efecto negativo de la expresión de los factores de reprogramación, es importante determinar los mecanismos moleculares activados responsables del efecto que vemos en las células A549 que expresan los factores de reprogramación. Para ello analizaremos marcadores moleculares de los principales procesos biológicos implicados en la viabilidad celular; marcadores de apoptosis celular, marcadores de senescencia celular, marcadores de daño al ADN y relacionados con los anteriores, también analizaremos el perfil de ciclo celular. En todos los casos, salvo que se indique lo contrario, las medidas se realizarán tras tres días de expresión de los factores de reprogramación.

1.3.3.1. Marcadores de apoptosis celular

Para evaluar la presencia de células apoptóticas en el cultivo utilizamos dos marcadores característicos de muerte celular programada. Por un lado, analizamos la presencia de Anexina V en la membrana plasmática por citometría de flujo. Esta proteína se une a residuos de fosfatidilserina, cuya presencia en la parte externa de la membrana se relaciona con apoptosis celular. Observamos un aumento

en los niveles de Anexina V en las células que expresan los factores de reprogramación (**Figura 7A**).

Por otro, analizamos los niveles de caspasa 3 cortada mediante citometría de flujo, la forma activa de una de las caspasas efectoras que media en el proceso de apoptosis celular. Observamos un aumento en los niveles de esta proteína en las células que expresan los factores de reprogramación (**Figura 7B**).

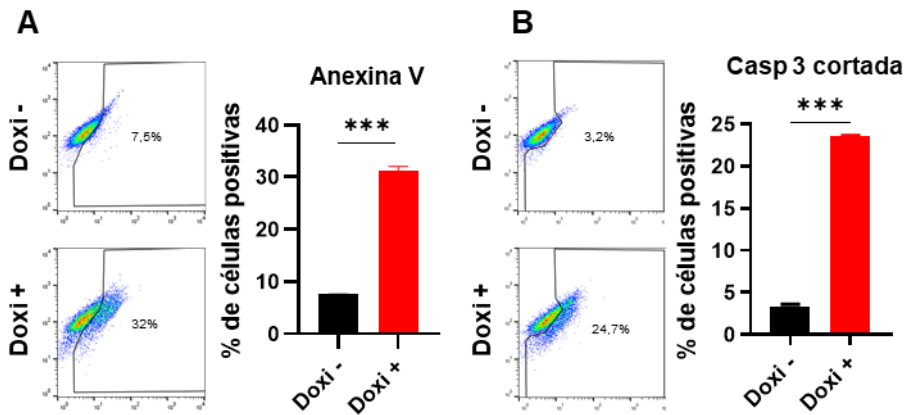


Figura 7. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre marcadores de muerte celular en células A549. **(A)** Análisis por citometría de flujo de los niveles de Anexina V (izquierda) y cuantificación (derecha). **(B)** Análisis por citometría de flujo de los niveles de caspasa 3 cortada (izquierda) y cuantificación (derecha). La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P < 0,001; ** P < 0,01; * P < 0,05.

Estos resultados parecen indicar un aumento en el número de células apoptóticas en la condición de expresión de los factores comparado con el control.

1.3.3.1.1. Tratamiento con inhibidores de apoptosis celular en células A549 que expresan los factores de reprogramación

Como observamos un aumento en la expresión de marcadores de apoptosis en las células que expresan los factores de reprogramación estudiamos si la inhibición de este proceso podría prevenir el efecto producido por los factores de reprogramación sobre las A549.

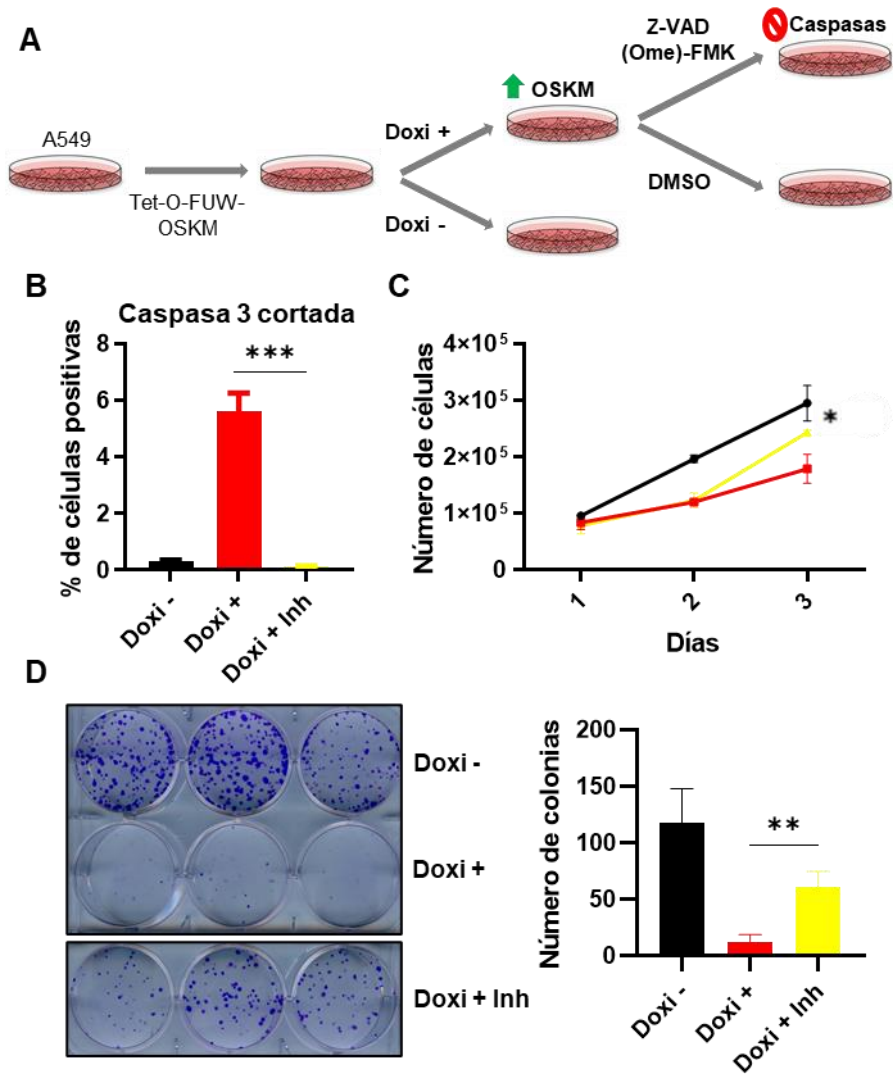


Figura 8. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre A549 tratadas con inhibidor de caspasas. (A) Representación esquemática del sistema empleado en los ensayos con el inhibidor de caspasas Z-VAD (Ome)-FMK. (B) Medida por citometría de flujo de los niveles de caspasa 3 cortada. (C) Análisis de la capacidad proliferativa por recuento con cámara de Neubauer en células A549 control y células A549 que expresan los factores de reprogramación tratadas o no con el inhibidor de caspasas. (D) Ensayo de expansión clonal. Placa de la tinción cristal violeta (izquierda) y cuantificación de la tinción (derecha).

Para ello tratamos las células A549 que expresan los factores de reprogramación con un inhibidor global de caspasas (Z-VAD, que bloquea el proceso de apoptosis al inhibir la actividad de estas proteínas) o con el vehículo DMSO (**Figura 8A**). En primer lugar, confirmamos el funcionamiento de este inhibidor al observar una bajada en los niveles de caspasa 3 cortada en las células que expresan los factores de reprogramación y que han sido tratadas con el inhibidor comparado con los observados en las mismas células tratadas con DMSO (**Figura 8B**). También analizamos la capacidad proliferativa de estas células observando una recuperación en las células tratadas con el inhibidor en comparación con las tratadas con el vehículo, tanto a tiempos cortos (**Figura 8C**) como a tiempos más largos en ensayos de clonogenicidad (**Figura 8D**).

Los resultados observados indican que la inhibición de la apoptosis en las células que expresan los factores de reprogramación revierte parcialmente el efecto de estos, puesto que las células no llegan a alcanzar los valores normales de proliferación, esto puede indicar que el proceso de apoptosis puede tener un papel importante en la respuesta a los factores pero que no es el único proceso que media en la respuesta a la expresión de estos.

1.3.3.2. Marcadores de senescencia celular

Para evaluar si la expresión de los factores de reprogramación promueve la entrada en senescencia en A549 analizamos diferentes marcadores asociados a este proceso.

En primer lugar, evaluamos la morfología celular observando un aumento en el número de células con la morfología típica de célula senescente; citoplasma grande, plano y multivesicular (Hayflick, 1965) en la condición de expresión de los factores comparado con el control (**Figura 9 A**).

Otra de las características que presentan las células senescentes es un gran aumento en la actividad de la enzima beta-galactosidasa. Para la detección de esta enzima utilizamos dos estrategias: mediante el uso de *galactón*, un sustrato quimioluminiscente (Bassaneze et al., 2008), y mediante el uso de un kit de detección por citometría de flujo. En ambos casos observamos un aumento para este marcador asociado a

senescencia en las células que expresan los factores de reprogramación comparados con el control (**Figura 9B**) y (**Figura 9C**).

Finalmente analizamos por qRT-PCR los niveles de expresión de los genes *IL6*, *CXCL1* y *CDKN1A*, que se ven aumentados en células senescentes. Observamos un aumento en la expresión de estos genes en células que expresan los factores de reprogramación con respecto al control (**Figura 9D**).

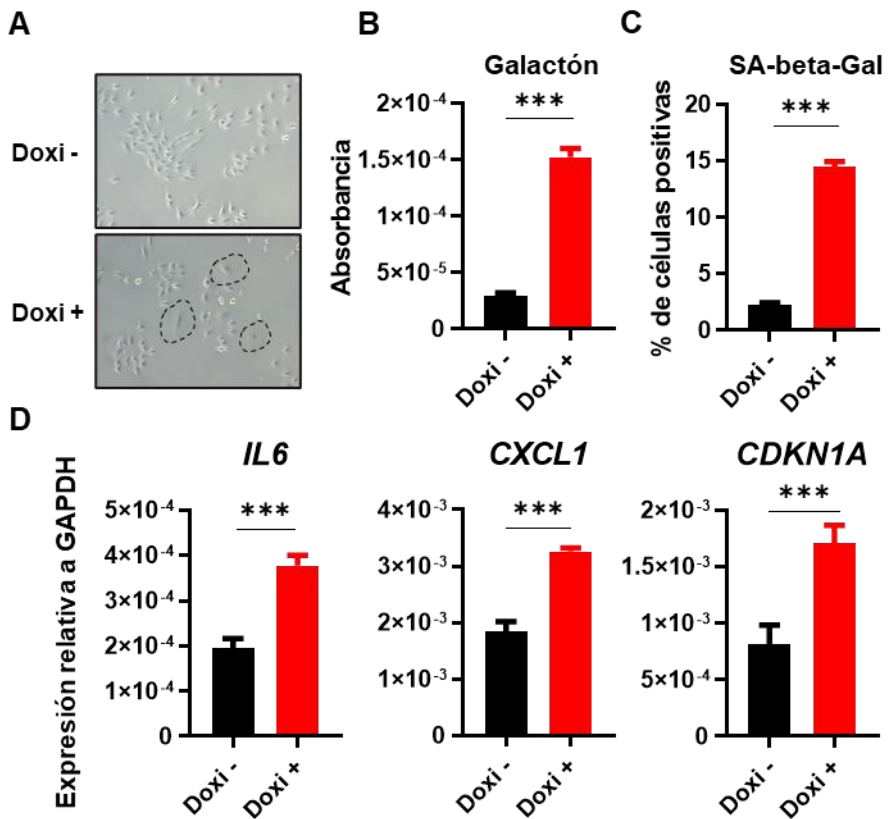


Figura 9. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre marcadores de senescencia celular en células A549. (A) Imágenes representativas con microscopía óptica de A549 que expresan (Doxi +) o no (Doxi-) los factores de reprogramación. (B) Medida de la actividad Beta-galactosidasa por *Galacton* relativizado al número de células. (C) Medida de la actividad Beta-galactosidasa por citometría de flujo (Cuantificación). (D) Niveles de expresión por qRT-PCR de los niveles de ARNm de: *IL6*, *CXCL1* y *CDKN1A*. La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P <0,001; ** P <0,01; * P <0,05.

Todos los marcadores analizados indican que la expresión de los factores de reprogramación aumenta la proporción de células senescentes en comparación con el control que no expresa los factores de reprogramación.

1.3.3.3. Marcadores de daño al ADN

Otro aspecto importante es determinar la presencia de daño en el ADN, puesto que es indicativo del nivel de inestabilidad genética que presenta nuestro cultivo celular y determina que las células dejen de proliferar con normalidad pudiendo entrar en senescencia o apoptosis celular.

Para evaluar el daño en el ADN analizamos por Western blot los niveles de la forma fosforilada de la histona H2AX (fosfo- γ H2AX), considerada un marcador de roturas en la doble hélice. Observamos un aumento en este marcador en las células que expresan los factores de reprogramación con respecto al control, así como un aumento en la expresión de los factores de reprogramación Klf4 y Oct4 que confirman el correcto funcionamiento del sistema de expresión de los factores (**Figura 10**).

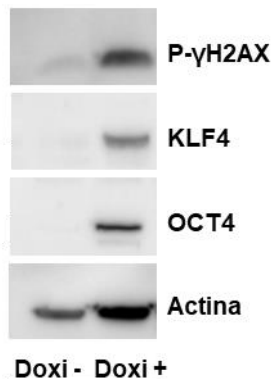


Figura 10. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre marcadores de daño en el ADN en células A549. Análisis por Western blot de los niveles de proteína para el marcador indicativo de roturas en la doble hebra fosfo-histona- γ H2AX (P- γ H2AX) y para los factores de reprogramación Klf4 y Oct4. Como control de carga utilizamos Actina.

1.3.3.4. Perfil de ciclo celular

Finalmente decidimos analizar el perfil de ciclo celular para observar cómo la expresión de los factores de reprogramación afecta al mismo. Para ello utilizamos yoduro de propidio que nos permite determinar el contenido de ADN de las células por citometría de flujo y clasificarlas en la fase del ciclo en la que encuentran; 2N fase G1, entre 2N y 4N fase S y 4N fase G2/M. Observamos una acumulación de células en las fases S y G2/M en las células que expresan los factores de reprogramación comparadas con el control (**Figura 11A**). Esta acumulación se correlaciona con un aumento observado por Western blot en la forma fosforilada e inactiva de la proteína RB (cuando está activa bloquea el avance en el ciclo de la fase G1 a la fase S) y por una bajada en la ciclina E (proteína que alcanza su pico de expresión en la fase G1 del ciclo celular) en las células que expresan los factores de reprogramación (**Figura 11B**).

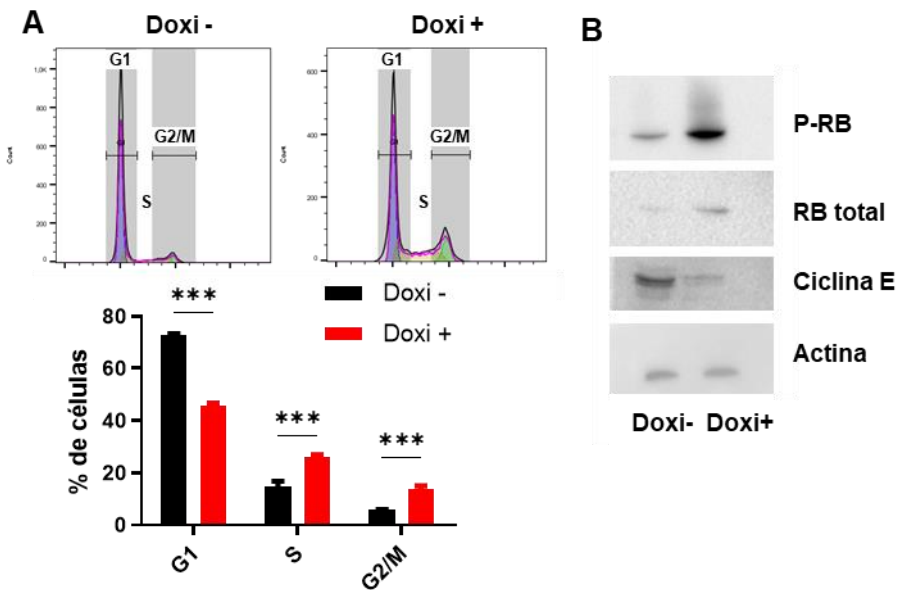


Figura 11. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre el perfil de ciclo celular en células A549. (A) Perfil de ciclo por citometría de flujo utilizando yoduro de propidio (paneles superiores) y cuantificación (panel inferior). **(B)** Análisis por Western blot de los niveles de proteínas para P-RB, RB total y Ciclina E. Como control de carga utilizamos Actina. La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P < 0,001; ** P < 0,01; * P < 0,05.

A lo largo de las diferentes fases del ciclo celular existen puntos de control en los que se revisa que el ADN de la célula esté en las condiciones adecuadas para progresar en el ciclo y dividirse. En caso de que se detecte daño o algún tipo de problema en el ADN estos puntos de control detienen el avance de la célula en el ciclo impidiendo su división y produciendo la entrada en senescencia o apoptosis. Por tanto, la acumulación de células que expresan los factores de reprogramación en las fases S y G2/M podría ser una consecuencia del aumento de la inestabilidad genética que ocasiona el arresto de estas en alguno de los puntos de control del ciclo, dificultando que avancen y completen el ciclo.

1.3.4. Efecto de los factores solubles secretados por células A549 que expresan los factores de reprogramación

Un aspecto importante es determinar si el efecto producido por los factores de reprogramación sobre las A549 es debido a procesos intrínsecos, es decir, que afectan a la propia célula que expresa los factores de reprogramación o si está mediado por factores solubles, es decir, si la célula que expresa los factores de reprogramación libera compuestos que afectan a células vecinas.

Para ello tratamos células A549 receptoras con medios condicionados procedentes de células A549 productoras que expresan o no los factores de reprogramación. Tras tres días de tratamiento hicimos un recuento para evaluar cómo habían proliferado ambos grupos de A549 receptoras y no observamos diferencias (**Figura 12A**). También realizamos ensayos de cocultivo en *transwell*. En este caso las células receptoras se siembran en el fondo de la placa y encima de estas se sitúa el *transwell* sobre el que se siembran las células productoras que expresan o no los factores de reprogramación. Tras tres días evaluamos la proliferación de ambos grupos de A549 receptoras y no observamos diferencias (**Figura 12B**).

Estos resultados indican que el efecto observado por los factores de reprogramación sobre células A549 es debido a procesos intrínsecos que afectan a la propia célula que expresa los factores y que no está mediado por factores solubles secretados por las mismas.

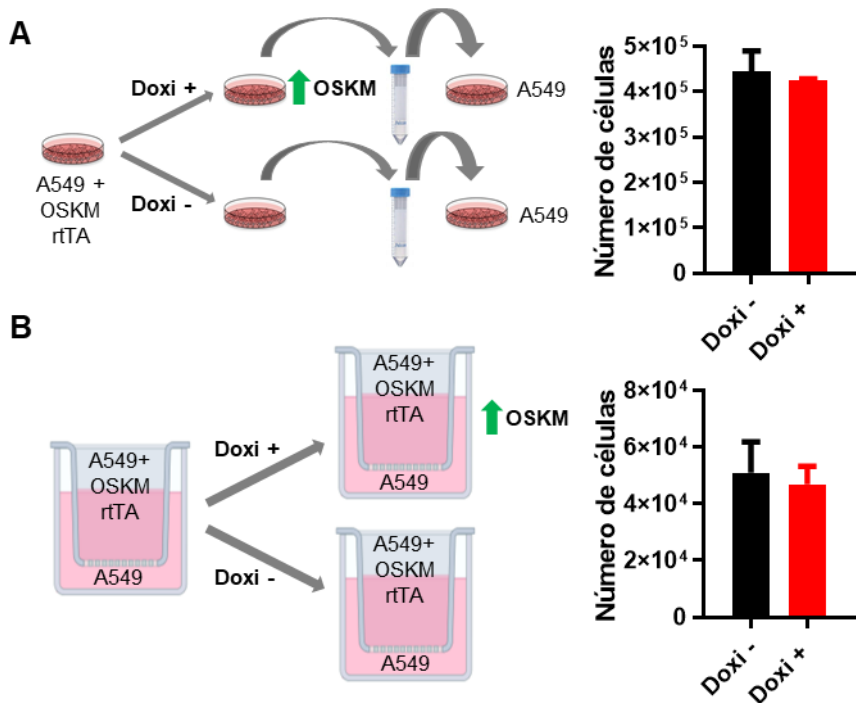


Figura 12. Efecto de los factores solubles producidos por células A549 que expresan los factores de reprogramación. (A) Representación esquemática del sistema empleado en los ensayos con medios condicionados (izquierda) y cuantificación de la capacidad proliferativa de las células receptoras tras 3 días (derecha). (B) Representación esquemática del sistema empleado en los ensayos de cocultivo en *transwell* (izquierda) y cuantificación de la capacidad proliferativa de las células receptoras tras 3 días (derecha).

1.3.5. Efecto de la inhibición de p21 en células A549 que expresan conjuntamente los factores de reprogramación

La principal vía activada como respuesta a cualquier estrés celular que produzca daño en el ADN es la de p53. Esta activación tiene como consecuencia la parada reversible en el ciclo celular, si el daño es capaz de corregirse, la entrada en senescencia o la apoptosis (Kastenhuber & Lowe, 2017). Como la principal diana de p53 es el gen *CDKN1A* que codifica la proteína p21 y además hemos observado un aumento en su expresión en la condición de expresión de los factores de reprogramación y se ha descrito que factores de reprogramación como

Klf4 activan la expresión de p21 en contextos de carcinoma ductal pancreático (Rowland et al., 2005) y cáncer colorrectal (Zhao et al., 2004), decidimos estudiar si el efecto observado por la expresión de los factores de reprogramación sobre las células A549 está mediado por p21.

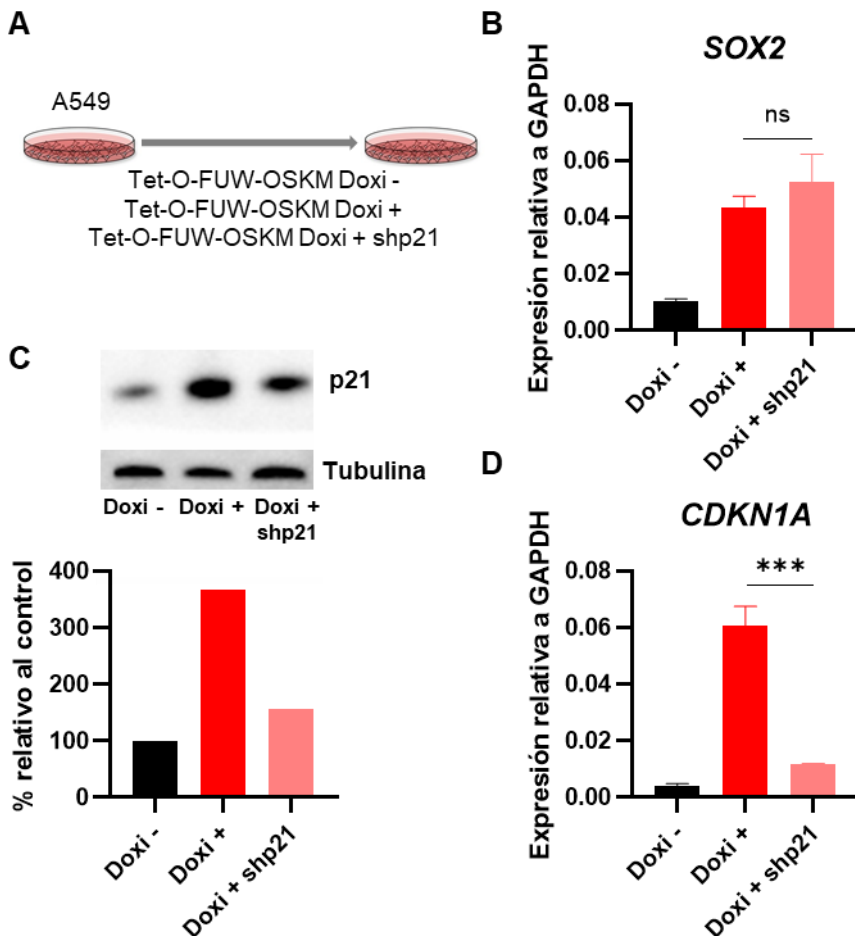


Figura 13. Sistema de inhibición de p21 en células A549 que expresan los factores de reprogramación. (A) Representación esquemática del sistema empleado en los ensayos. (B) Niveles de expresión por qRT-PCR de los niveles de ARNm de *SOX2*. (C) Análisis por Western blot de los niveles de proteínas para p21 (panel superior) y cuantificación (panel inferior). Como control de carga utilizamos Tubulina. (D) Niveles de expresión por qRT-PCR del ARNm de *CDKN1A*. La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P < 0,001; ** P < 0,01; * P < 0,05.

1.3.5.1. Sistema de inhibición de p21 en A549

Para estudiar el efecto de la bajada en los niveles de expresión de p21 en el contexto de expresión de los factores de reprogramación introdujimos en las células A549 el vector lentiviral LT3GEPIR-*shp21* que codifica para un *shp21* (*short hairpin RNA* contra p21) y que es inducible por doxiciclina, de modo que en presencia de doxiciclina la expresión de p21 estará disminuida (**Figura 13A**).

En primer lugar, comprobamos que la introducción de este vector no afectase a la expresión de los factores de reprogramación. Para ello analizamos por qRT-PCR la expresión del factor de reprogramación *Sox2* observando que no existen diferencias entre las células que portan o no el *shp21* (**Figura 13B**). También analizamos por Western blot (**Figura 13C**) y por qRT-PCR (**Figura 13D**) los niveles de expresión de p21 y del gen que codifica para este respectivamente, observando que el aumento de p21 producido por la expresión de los factores de reprogramación es revertido casi en su totalidad por la expresión del *shp21*. Por lo tanto, este sistema es funcional para bloquear la expresión de p21 en células A549. El siguiente paso es el de analizar si la inhibición de p21 revierte los efectos producidos por la expresión de los factores de reprogramación en A549.

1.3.5.2. Efecto sobre la capacidad proliferativa

Para evaluar cómo la bajada en los niveles de expresión de p21 afecta a la capacidad proliferativa en el contexto de expresión de los factores de reprogramación realizamos un ensayo de clonogenicidad durante catorce días y observamos como las células que expresan el *shp21* recuperan parcialmente la capacidad proliferativa perdida por la expresión de los factores de reprogramación, aunque esta recuperación no es total puesto que todavía es inferior a la observada en las células que no expresan los factores de reprogramación (**Figura 14**).

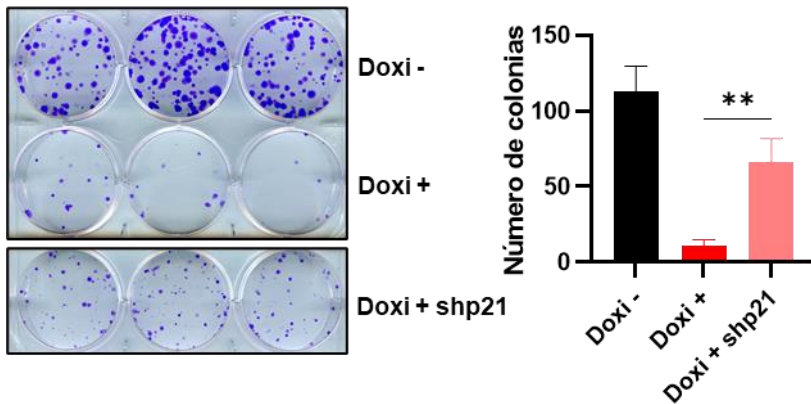


Figura 14. Efecto de la inhibición de p21 sobre la capacidad proliferativa en células A549 que expresan los factores de reprogramación. Ensayo de expansión clonal. Placa de la tinción cristal violeta (izquierda) y cuantificación de la tinción (derecha). La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P <0,001; ** P <0,01; * P <0,05.

1.3.5.3. Marcadores de apoptosis celular

Finalmente, comprobamos cómo la bajada en los niveles expresión de p21 afecta a los marcadores de apoptosis en el contexto de expresión de los factores de reprogramación. Analizamos por citometría de flujo el porcentaje de células positivas para Anexina V y observamos cómo la bajada en los niveles de expresión de p21 reduce a niveles similares a los del control el porcentaje de células positivas para este marcador (Figura 15).

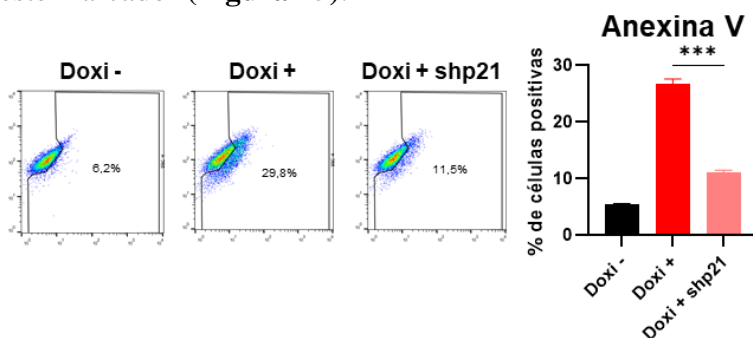


Figura 15. Efecto de la inhibición de p21 sobre marcadores de muerte celular en células A549 que expresan los factores de reprogramación. Medida de Anexina V por citometría de flujo (izquierda) y cuantificación (derecha). La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P <0,001; ** P <0,01; * P <0,05.

Estos resultados parecen indicar que la inhibición de p21 revierte en buena parte el efecto que la expresión de los factores de reprogramación produce en las células A549, aunque esta reversión no es completa puesto que en ningún caso se alcanzan los mismos valores para los marcadores analizados que en la condición control que no expresa los factores.

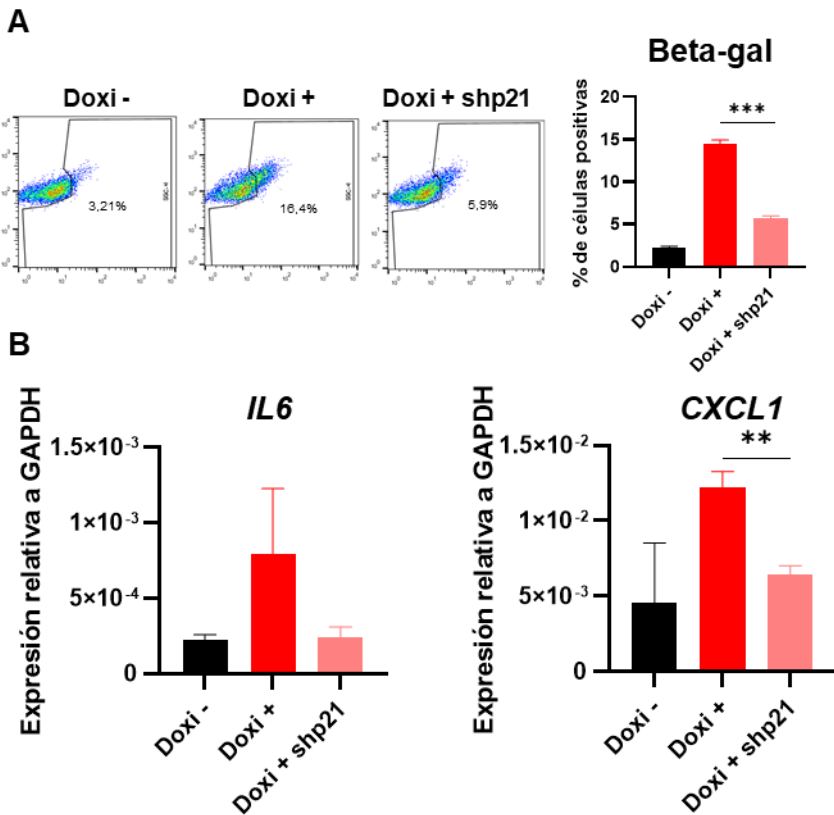


Figura 16. Efecto de la inhibición de p21 sobre marcadores de senescencia en células A549 que expresan los factores de reprogramación. (A) Medida de la actividad Beta-galactosidasa por citometría de flujo (izquierda) y cuantificación (derecha). (B) Niveles de expresión por qRT-PCR del ARNm de *IL6* y *CXCL1*. La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P < 0,001; ** P < 0,01; * P < 0,05.

1.3.5.4. Marcadores de senescencia celular

Para evaluar cómo la bajada en los niveles de expresión de p21 afecta a los marcadores de senescencia en el contexto de expresión de los factores de reprogramación analizamos la actividad de la enzima beta-galactosidasa por citometría de flujo y observamos cómo el porcentaje de células positivas, que se ve aumentado por la expresión de los factores de reprogramación, disminuye en la condición que expresa el *shp21* hasta valores próximos a los del control (**Figura 16A**). Además, analizamos la expresión por qRT-PCR de los genes *IL6* y *CXCL1* y observamos cómo la inhibición de p21 restaura sus niveles a valores similares a los del control (**Figura 16B**).

1.3.6. Efecto de la expresión individual de los factores de reprogramación sobre A549 utilizando vectores retrovirales

Hasta ahora hemos estudiado el efecto de la expresión combinada de los factores de reprogramación en células A549. Para evaluar el efecto individual de cada uno de los factores de reprogramación introdujimos en células A549 vectores retrovirales que expresan individualmente los factores de reprogramación (pMXs- Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc). Como control positivo del efecto de los factores utilizamos el vector lentiviral policistrónico utilizado en experimentos anteriores, como control negativo utilizamos un plásmido que expresa GFP (pBP-IRES-EGFP) y no afecta a las A549 y además incluimos la combinación de los vectores retrovirales (**Figura 17A**).

Analizamos cómo la expresión individual de los factores de reprogramación afecta a la capacidad proliferativa a tiempos cortos en A549 y tras tres días de expresión observamos tres grupos diferenciados: en primer lugar, tenemos el grupo de factores formado por *Sox2* y *Myc* que no afecta a la capacidad proliferativa con respecto al control de GFP. En segundo, tenemos el grupo formado por *Klf4*, *Oct4* y la combinación de los vectores retrovirales OSKM, que reduce parcialmente la capacidad proliferativa con respecto al control que expresa GFP, pero no llega a los valores de nuestro control positivo. Finalmente, tenemos el grupo formado por el vector policistrónico lentiviral que presenta el efecto más fuerte sobre la disminución de la capacidad proliferativa (**Figura 17B**).

También analizamos la capacidad proliferativa a tiempos largos realizando ensayos de clonogenicidad y los resultados observados son similares a los obtenidos a tiempos cortos (**Figura 17C**).

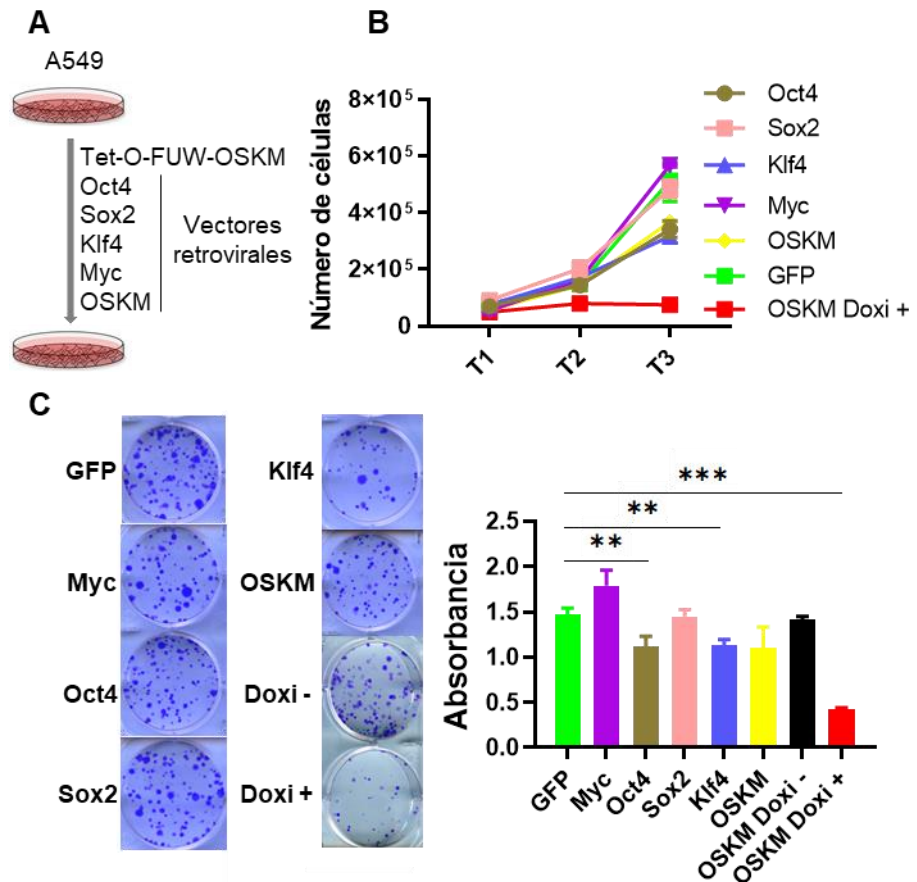


Figura 17. Efecto de la expresión de diferentes combinaciones de factores de reprogramación utilizando vectores retrovirales en A549. (A) Representación esquemática del sistema empleado en los ensayos. (B) Análisis de la capacidad proliferativa por recuento con cámara de Neubauer en células A549 que expresan diferentes combinaciones de los factores de reprogramación. (C) Ensayo de expansión clonal. Placas de la tinción cristal violeta (izquierda) y cuantificación de la tinción (derecha). La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P <0,001; ** P <0,01; * P <0,05.

1.3.7. Efecto dosis-dependiente de la expresión de los factores de reprogramación en células A549

Las diferencias observadas en la capacidad proliferativa entre la combinación retroviral de OSKM y el vector lentiviral policistrónico nos llevó a pensar que quizás esta diferencia sea debida al nivel de expresión de los factores de reprogramación que los vectores utilizados son capaces de conseguir.

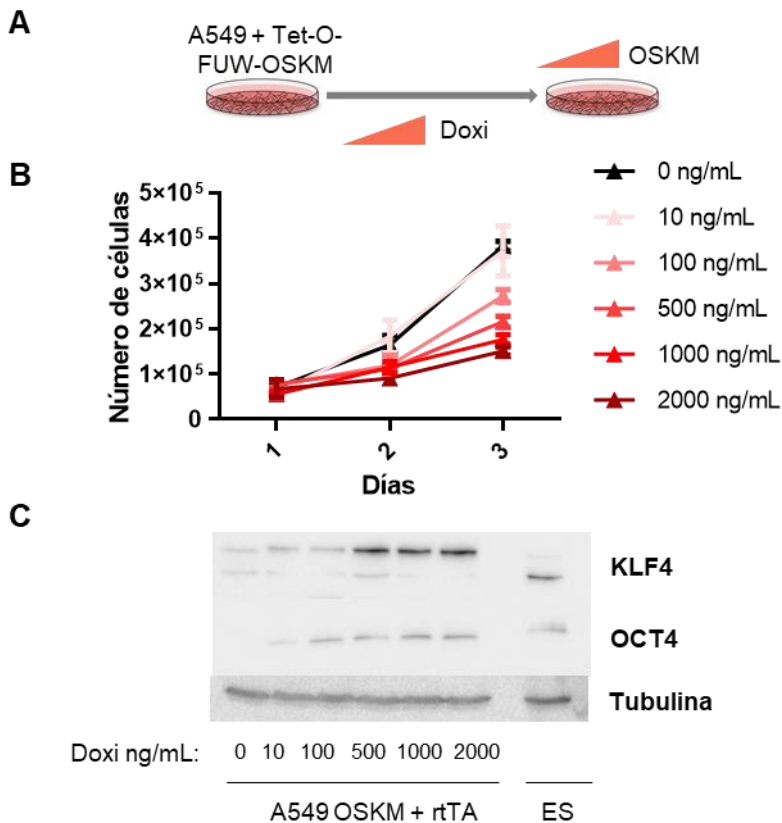


Figura 18. Efecto de la expresión de diferentes niveles de los factores de reprogramación en A549. (A) Representación esquemática del sistema empleado en los ensayos. (B) Análisis de la capacidad proliferativa por recuento con cámara de Neubauer en células A549 que expresan en diferentes cantidades los factores de reprogramación. (C) Análisis por Western blot de los niveles de proteína para KLF4 y OCT4. Como control de carga utilizamos Tubulina.

Para analizar si la respuesta de las A549 a los factores de reprogramación es dosis-dependiente utilizamos el vector lentiviral policistrónico y añadimos diferentes cantidades de doxiciclina al medio de cultivo para regular los niveles de expresión de los factores, por lo que esperamos que a dosis crecientes de doxiciclina la expresión sea mayor hasta que se alcance el nivel máximo que el vector es capaz producir (**Figura 18A**).

Analizamos a tiempos cortos y utilizando diferentes concentraciones de doxiciclina la capacidad de proliferación de las células y observamos cómo a dosis crecientes el efecto sobre la capacidad proliferativa es mayor (**Figura 18B**). También analizamos que la doxiciclina no afectase a la capacidad proliferativa en A549 a esas concentraciones. Además, analizamos por Western blot los niveles de proteína de Klf4 y Oct4 y observamos cómo a dosis mayores de doxiciclina el nivel de estas proteínas es mayor. Como control positivo de células que expresan estas proteínas en el Western blot incluimos extractos de células madre embrionarias (ESC, *Embryonic Stem Cells*) (**Figura 18C**).

1.3.8. Efecto de la expresión individual de los factores de reprogramación sobre A549 utilizando vectores lentivirales

Una vez determinado que el efecto de los factores de reprogramación es dosis-dependiente, decidimos buscar un sistema de expresión individual de los factores que nos asegure unos niveles de expresión de los factores de reprogramación similares a los obtenidos con el vector policistrónico lentiviral. Para ello utilizamos los vectores lentivirales TetO-FUW-Oct4, -Sox2, -Klf4 y -c-Myc coinfectados con el vector lentiviral FUW-M2rtTA, lo que en presencia de doxiciclina permite la expresión de la construcción (**Figura 19A**). Analizamos los niveles de expresión de cada uno de los factores de reprogramación por qRT-PCR y los comparamos con los obtenidos con el vector policistrónico lentiviral utilizado en los experimentos previos; observamos cómo con este sistema de expresión individual se alcanzan niveles similares a nuestro control positivo (**Figura 19B**).

Una vez validada la funcionalidad del sistema decidimos analizar, como hicimos anteriormente, marcadores moleculares de los

principales procesos biológicos implicados en la viabilidad celular con el objetivo de identificar la contribución individual de cada uno de los factores a estos procesos. En todos los casos, salvo que se indique lo contrario, las medidas se realizarán tras tres días de expresión de los factores de reprogramación. Como control positivo utilizaremos las células que expresan conjuntamente los factores de reprogramación y como control negativo las células que portan la construcción con los factores pero que no ha sido activada y por lo tanto no expresan los factores de reprogramación.

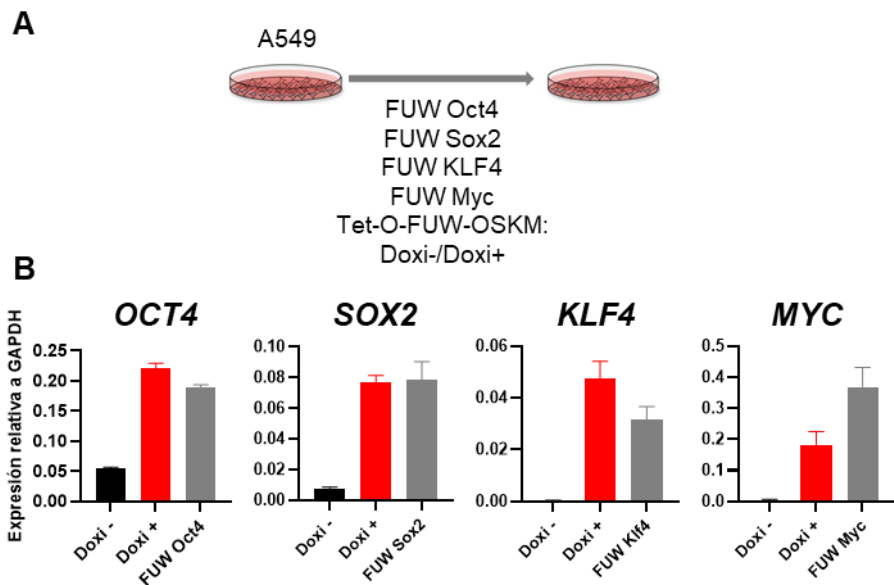


Figura 19. Sistema de expresión individual de los factores de reprogramación utilizando vectores lentivirales en A549. (A) Representación esquemática del sistema empleado en los ensayos. (B) Niveles de expresión por qRT-PCR de los niveles de ARNm de: *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *MYC*.

1.3.8.1. Efecto sobre la capacidad proliferativa

En primer lugar, evaluamos el efecto de la expresión individual de los factores de reprogramación sobre la capacidad proliferativa. A tiempos cortos observamos dos grupos claramente diferenciados; por un lado, el grupo formado por las células que expresan individualmente los factores de reprogramación *Sox2* y *c-Myc*

además de nuestro control negativo, que no afectan a la capacidad proliferativa. Por otro, un grupo formado por las células que expresan individualmente los factores de reprogramación *Klf4* y *Oct4* además de nuestro control positivo, que disminuyen la capacidad proliferativa de las células A549 (**Figura 20A**).

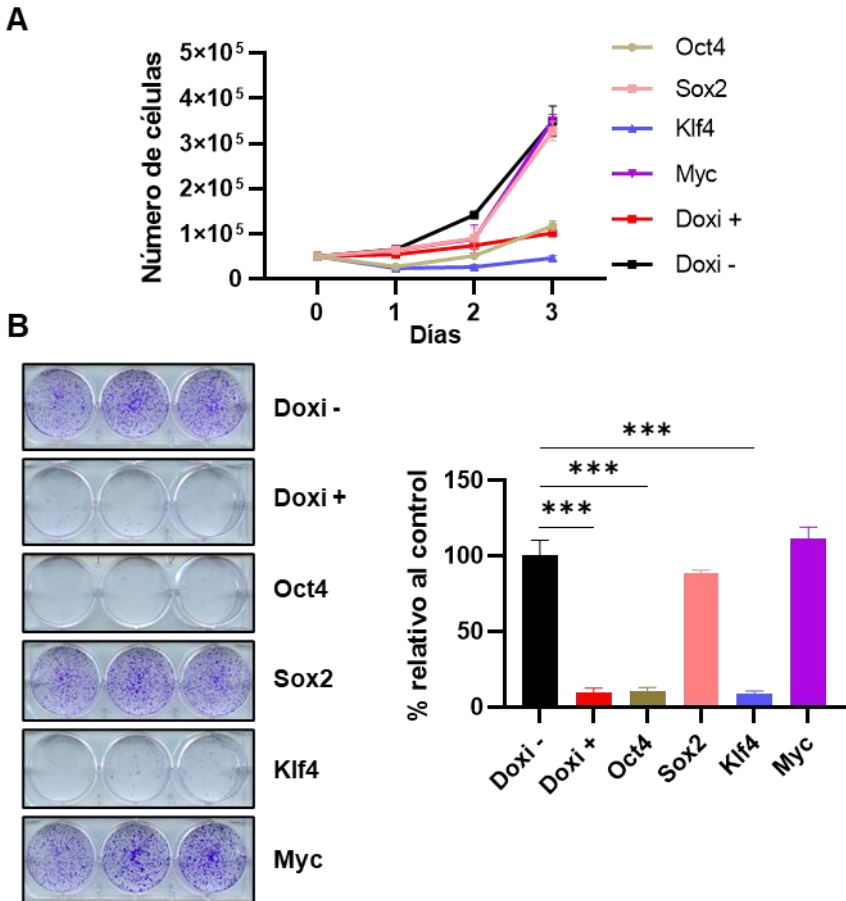


Figura 20. Efecto sobre la capacidad proliferativa de la expresión individual de los factores de reprogramación utilizando vectores lentivirales en A549. (A) Análisis de la capacidad proliferativa por recuento con cámara de Neubauer en células A549 que expresan individualmente los factores de reprogramación. (B) Ensayo de expansión clonal. Placas de la tinción cristal violeta (izquierda) y cuantificación de la tinción (derecha). La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P <0,001; ** P <0,01; * P <0,05.

También analizamos el efecto sobre la capacidad proliferativa a tiempos largos mediante ensayos de clonogenicidad. Los resultados observados son muy similares a los obtenidos a tiempos cortos; los factores de reprogramación *Sox2* y *c-Myc* no afectan a la capacidad proliferativa, mientras que los factores *Klf4* y *Oct4* la reducen considerablemente hasta valores similares a los del control positivo (**Figura 20B**).

1.3.8.2. Marcadores de apoptosis celular

Para evaluar el efecto de la expresión individual de los factores de reprogramación sobre el proceso de apoptosis celular analizamos por citometría de flujo el marcador indicativo de apoptosis celular Anexina V. Observamos un aumento en el porcentaje de células positivas para este marcador en las condiciones de expresión de *Klf4* y *Oct4*, mientras que en las condiciones de expresión de *Sox2* y *c-Myc* este aumento no se produce y los niveles se mantienen en valores similares a los del control negativo que no expresa los factores (**Figura 21**).

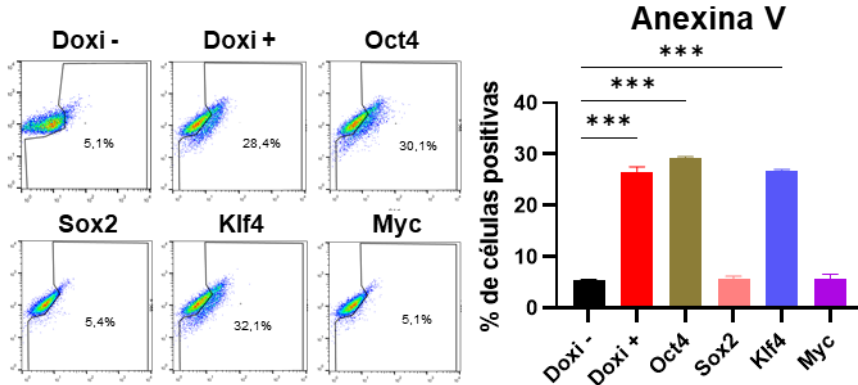


Figura 21. Efecto de la expresión individual de los factores de reprogramación utilizando vectores lentivirales sobre marcadores de muerte celular en células A549. (A) Niveles de Anexina V medidos por citometría de flujo (izquierda) y cuantificación (derecha). La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P <0,001; ** P <0,01; * P <0,05.

1.3.8.3. Marcadores de senescencia celular

Para evaluar el efecto de la expresión individual de los factores de reprogramación sobre el proceso de senescencia celular, en primer lugar, analizamos la morfología de las células. Observamos un aumento en el número de células con morfología típica de célula senescente; citoplasma grande, plano y multivesicular (Hayflick, 1965), en las condiciones que expresan individualmente los factores de reprogramación *Klf4* y *Oct4*, mientras que en el caso de las células que expresan individualmente *Sox2* y *Myc* no se observaron estos cambios (**Figura 22A**).

También analizamos la actividad de la enzima beta-galactosidasa por citometría de flujo observando un aumento en el porcentaje de células positivas en las condiciones en las que se expresa *Klf4* y *Oct4*, mientras que las condiciones en las que se expresa *Sox2* y *c-Myc* este aumento no se produce y el porcentaje de células positivas se mantiene en unos valores similares a los del control negativo (**Figura 22B**).

La expresión individual de *Klf4* y *Oct4* es suficiente para aumentar los niveles de marcadores de senescencia celular hasta niveles similares a los observados con la expresión conjunta de los factores de reprogramación.

La expresión individual de *Klf4* y *Oct4* parece ser suficiente para afectar a la capacidad proliferativa, aumentar marcadores de senescencia celular y marcadores de apoptosis celular hasta valores similares a los observados por la expresión conjunta de los factores. Todos estos resultados parecen indicar que los factores responsables de reducir la viabilidad celular causando un aumento de marcadores de senescencia y apoptosis celular en A549 son *Klf4* y *Oct4*, mientras que la expresión de *Sox2* y *c-Myc* parece no afectar a las células, resultando inocua.

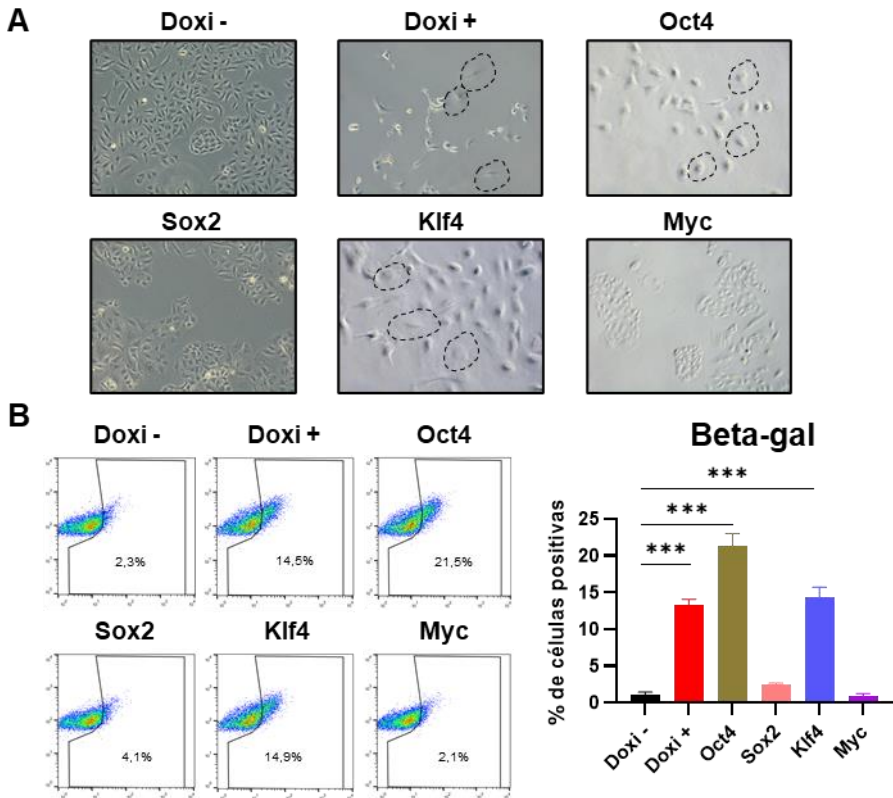


Figura 22. Efecto de la expresión individual de los factores de reprogramación utilizando vectores lentivirales sobre marcadores de senescencia celular en células A549. **(A)** Imágenes representativas con microscopía óptica de A549 que expresan individualmente los factores de reprogramación. **(B)** Medida de la actividad Beta-galactosidasa por citometría de flujo. La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P <0,001; ** P <0,01; * P <0,05.

1.3.9. Efecto de la inhibición de p21 en células A549 que expresan individualmente los factores de reprogramación

Previamente demostramos que p21 juega un papel importante en la respuesta de las células A549 a la expresión de los factores de reprogramación. Por ello nos planteamos estudiar si p21 también media en la respuesta a la expresión individual de los factores de reprogramación.

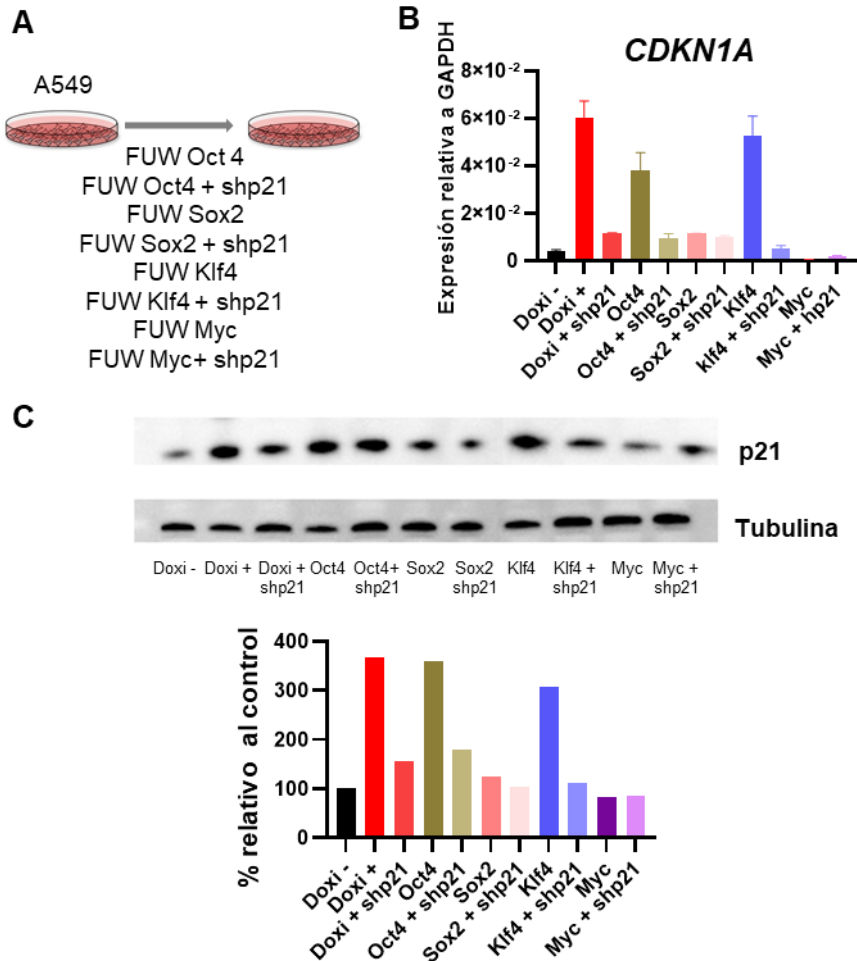


Figura 23. Sistema de inhibición de p21 en células A549 que expresan individualmente los factores de reprogramación. (A) Representación esquemática del sistema empleado en los ensayos. (B) Niveles de expresión por qRT-PCR de los niveles de ARNm de *CDKN1A*. (C) Análisis por Western blot de los niveles de proteína para p21 (panel superior) y cuantificación (panel inferior). Como control de carga utilizamos Tubulina. La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P <0,001; ** P <0,01; * P <0,05.

En primer lugar, analizamos por qRT-PCR y Western blot sus niveles de expresión y observamos un aumento tanto a nivel de ARNm (**Figura 23B**) como a nivel de proteína (**Figura 23C**) en las condiciones

de expresión de *Klf4* y *Oct4*, lo que recapitula el aumento observado en la condición de expresión conjunta de los factores de reprogramación. Por el contrario, en las condiciones de expresión de *Sox2* y *c-Myc* este aumento no se detecta y los niveles de p21 se mantienen próximos a los observados en el control negativo que no expresa los factores de reprogramación.

Para estudiar si este aumento de p21 participa en el efecto observado en las células A549 que expresan individualmente los factores de reprogramación introdujimos en ellas el *shp21* utilizado previamente (**Figura 23A**).

Analizamos por qRT-PCR los niveles de expresión del gen *CDKN1A*, que codifica para p21, y observamos cómo el aumento producido por la expresión individual de los factores *Klf4* y *Oct4* es reducido a niveles similares a los del control que no expresa los factores de reprogramación. Como era de esperar, los niveles en las condiciones de expresión de *Sox2* y *c-Myc* no variaron notablemente puesto que al no producir un aumento en la expresión de este gen los niveles de partida son bajos (**Figura 23B**). Estos resultados se observaron también a nivel de proteína por Western blot (**Figura 23C**).

Una vez comprobado que el *shp21* es una estrategia funcional para producir una bajada de p21 en un contexto de expresión individual de los factores analizamos cómo la bajada en los niveles expresión de p21 afecta a la viabilidad celular y a procesos que juegan un papel importante sobre esta como la senescencia o la apoptosis celular.

1.3.9.1. Efecto sobre la capacidad proliferativa

Para evaluar si la bajada en los niveles expresión de p21 puede recuperar la reducción en la capacidad provocada por la expresión individual de algunos factores realizamos un ensayo de clonogenicidad. Vemos cómo la inhibición de p21 recupera parcialmente la caída en la capacidad proliferativa observada en las condiciones de expresión de los factores *Klf4* y *Oct4*. Mientras que la inhibición de p21 no varía la capacidad proliferativa de las células que expresan individualmente *Sox2* y *c-Myc* (**Figura 24**).

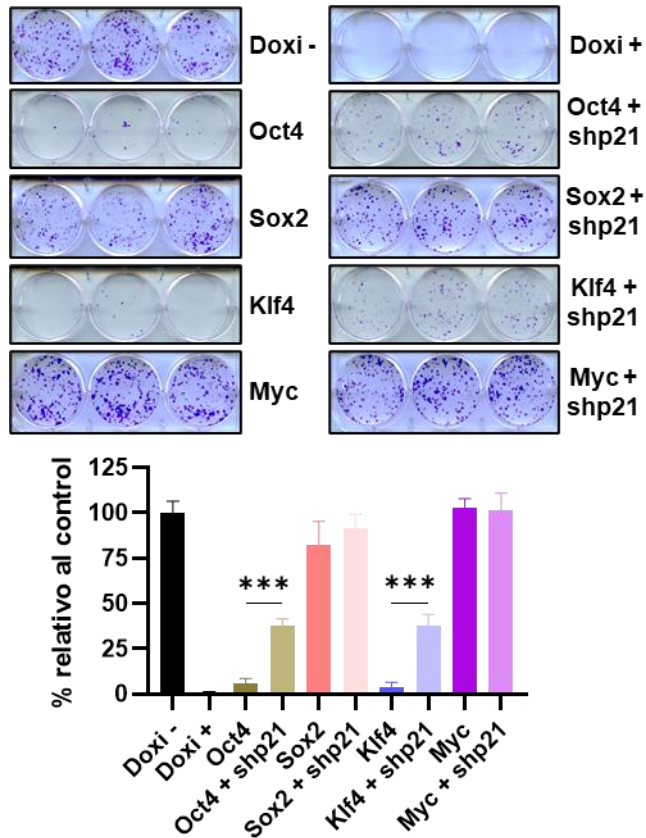


Figura 24. Efecto de la inhibición de p21 sobre la capacidad proliferativa en células A549 que expresan individualmente los factores de reprogramación. Ensayo de expansión clonal. Placa con la tinción cristal violeta (panel superior) y cuantificación de la tinción (panel inferior). La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P <0,001; ** P <0,01; * P <0,05.

1.3.9.2. Marcadores de apoptosis celular

Para evaluar cómo la bajada en los niveles expresión de p21 afecta al proceso de apoptosis celular analizamos por citometría de flujo el marcador Anexina V. Observamos cómo el aumento para este marcador producido en las condiciones de expresión de *Klf4* y *Oct4* es revertido a valores próximos a los del control negativo por la bajada en los niveles expresión de p21. La bajada de p21 no varía los valores para este marcador en las condiciones de expresión Sox2 y c-Myc (Figura

25).

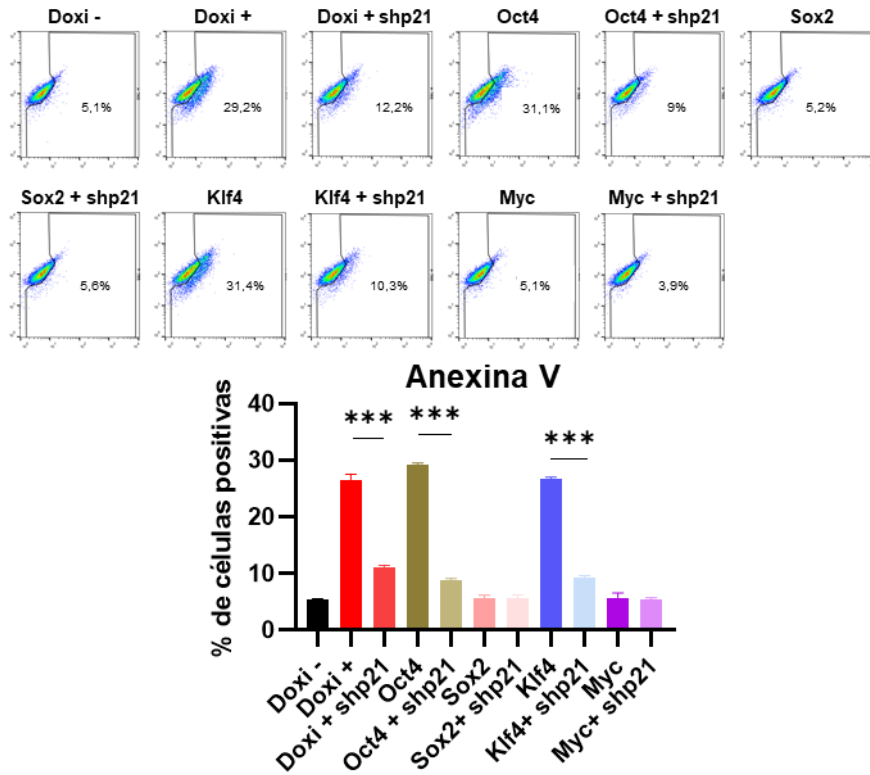


Figura 25. Efecto de la inhibición de p21 sobre marcadores de muerte celular en células A549 que expresan los factores de reprogramación. Medida de Anexina V por citometría de flujo (panel superior) y cuantificación (panel inferior). La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P <0,001; ** P <0,01; * P <0,05.

La bajada en los niveles de expresión de p21 parece revertir en parte los efectos perjudiciales provocados por la expresión de estos factores. Esto indica que p21 tiene un papel importante en la respuesta de las células A549 a la expresión de los factores de reprogramación. Como este efecto es parcial, esto podría indicar que existen otras vías que median en la respuesta celular a la expresión de los factores.

1.3.9.3. Marcadores de senescencia celular

Finalmente, para evaluar cómo la inhibición de p21 afecta al proceso de senescencia celular analizamos por citometría de flujo la

actividad de la enzima beta-galactosidasa. Observamos cómo el aumento para este marcador producido en las condiciones de expresión de *Klf4* y *Oct4* es parcialmente revertido por la bajada en los niveles de expresión de p21. La bajada de p21 no varía los valores para este marcador en las condiciones de expresión de *Sox2* y *c-Myc* (**Figura 26**).

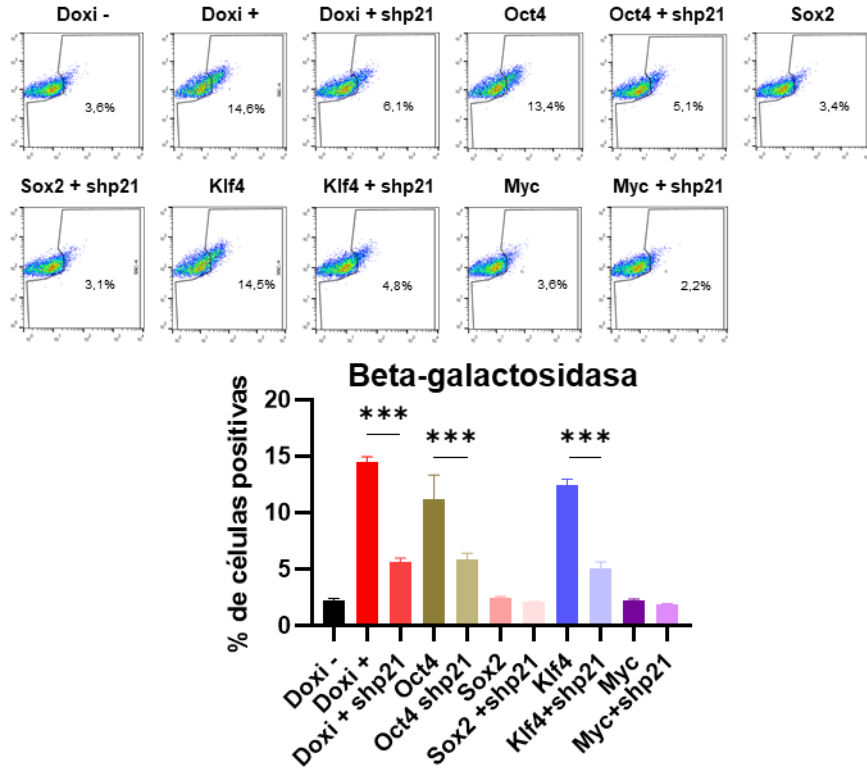


Figura 26. Efecto de la inhibición de p21 sobre marcadores de senescencia en células A549 que expresan individualmente los factores de reprogramación. Medida de la actividad Beta-galactosidasa por citometría de flujo (panel superior) y cuantificación (panel inferior). La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P <0,001; ** P <0,01; * P <0,05.

2. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre la progresión tumoral

Hasta ahora, los experimentos realizados se centraron en estudiar el efecto de los factores de reprogramación sobre células transformadas en sistemas *in vitro*. Para estudiar el efecto de los factores de reprogramación en un contexto fisiológico que se aproxime más al ambiente real en el que se desarrollan los eventos de transformación celular y progresión tumoral utilizaremos diferentes modelos animales.

2.1. ENSAYOS DE DESARROLLO TUMORAL POR INYECCIÓN SUBCUTÁNEA DE CÉLULAS A549 QUE EXPRESAN O NO LOS FACTORES DE REPROGRAMACIÓN EN RATONES NMRI-*FoxN1*^{NU/NU}

Para estudiar cómo la expresión de los factores de reprogramación afecta a la capacidad de formación de tumores de las A549 utilizamos ratones *nude*. Como estos ratones están inmunodeprimidos las células tumorales humanas pueden crecer sin ser atacadas por el sistema inmune del ratón, pudiendo formar tumores.

En estos ratones se inyectaron subcutáneamente células A549 que portan la construcción con los factores de reprogramación y el rtTA, de modo que en presencia de doxíciclina estas células expresarán los factores de reprogramación (condición 4F), y células que solo portan el rtTA como control, por lo que en presencia de doxíciclina no expresarán los factores de reprogramación (condición TA). Además, ambos grupos celulares portan una construcción que expresa la enzima luciferasa y que nos permitirá analizar el crecimiento tumoral por emisión de luminiscencia cuando los ratones son tratados con luciferina. Los ratones fueron tratados con doxíciclina en agua de bebida durante la duración de todo el experimento (**Figura 27A**).

El crecimiento tumoral se analizó por IVIS (*Spectrum In Vivo Imaging System*) realizando una medición semanal: Observamos cómo durante las dos primeras semanas se produce una disminución en el crecimiento de las células que expresan los factores de reprogramación (flanco derecho) en comparación con el control (flanco izquierdo). Pese a que estas diferencias se atenúan con el paso del tiempo, se observa

una tendencia en la que las células que expresan los factores de reprogramación presentan mayor dificultad para formar tumores y crecer que las células control (**Figura 27B**). La variación observada en cuanto a la capacidad para formar tumores en la condición de expresión de los factores de reprogramación puede ser debida a que las construcciones utilizadas no nos permiten seleccionar únicamente aquellas células que portan los factores de reprogramación por lo que no podemos obtener un cultivo homogéneo.

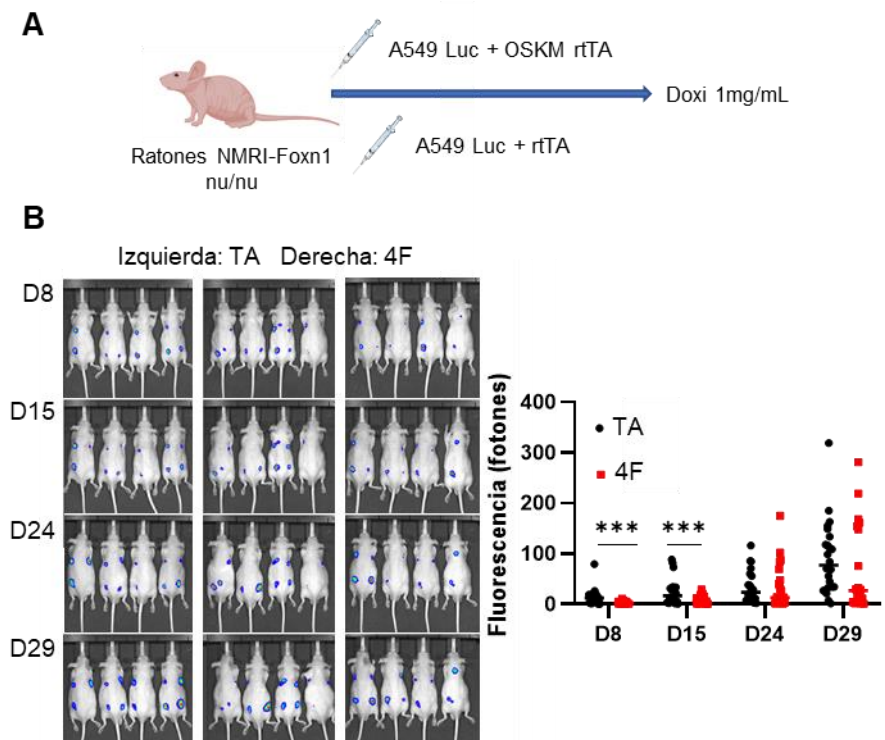


Figura 27. Ensayo de formación de tumores por inyección subcutánea en ratones inmunodeprimidos. (A) Representación esquemática del sistema empleado en los ensayos. **(B)** Cuantificación del desarrollo tumoral utilizando el IVIS. Se muestran imágenes tomadas con el IVIS durante los diferentes días del experimento (izquierda) y la cuantificación de los valores obtenidos (derecha). La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

2.2. ENSAYOS DE FORMACIÓN TUMORAL POR INYECCIÓN EN VENA DE COLA DE CÉLULAS Cml57 QUE EXPRESAN O NO LOS FACTORES DE REPROGRAMACIÓN EN RATONES C57BL/6

Los siguientes experimentos se realizaron en colaboración con el grupo del Dr. Daniel Muñoz Espín de la Universidad de Cambridge.

Para estudiar cómo la expresión de los factores de reprogramación afecta a la capacidad de formación de tumores de las células Cml57 (células de adenocarcinoma de pulmón de ratón) utilizamos ratones C57BL/6 previamente radiados para facilitar el asentamiento de las células inyectadas.

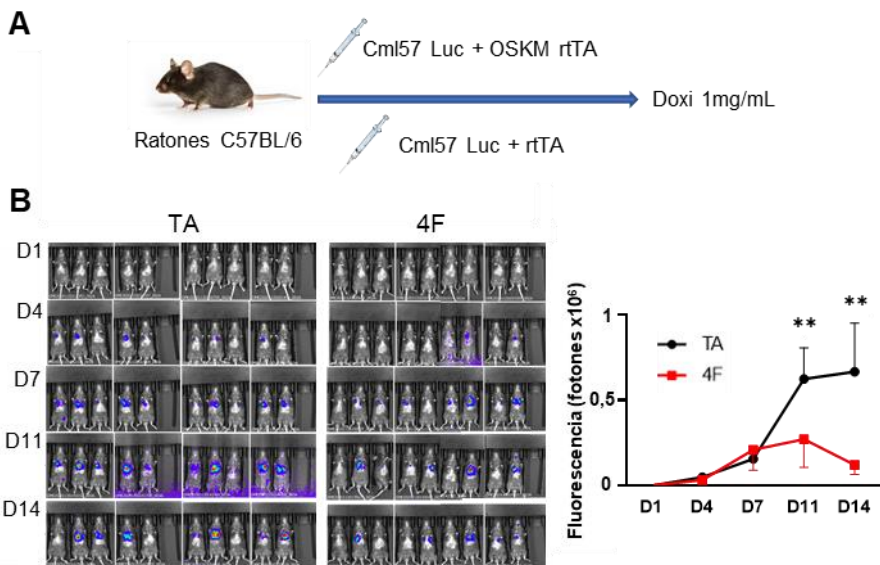


Figura 28. Ensayo de formación tumoral por inyección en vena de cola en ratones C57BL/6. (A) Representación esquemática del sistema empleado en los ensayos. **(B)** Cuantificación del desarrollo tumoral utilizando el IVIS. Se muestran imágenes tomadas con el IVIS durante los diferentes días del experimento (izquierda) y la cuantificación de los valores obtenidos (derecha). La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

En estos ratones se inyectaron en vena de cola células Cml57 que portan la construcción con los factores de reprogramación y el rtTA (condición 4F) o células que solo portan el rtTA como control (condición TA). En este caso podemos seleccionar aquellas células que portan los factores de reprogramación gracias a que la construcción va

acoplada a una proteína naranja fluorescente (mOrange) y el rtTA porta un gen de resistencia al antibiótico puromicina. Además, ambos grupos celulares portan una construcción que expresa la enzima luciferasa y que nos permitirá analizar el crecimiento tumoral por emisión de luminiscencia cuando los ratones son tratados con luciferina. Los ratones fueron tratados con doxiciclina en agua de bebida durante la duración de todo el experimento (**Figura 28A**).

Las Cml57 inyectadas en vena de cola se asientan en pulmón formando tumores. Analizamos el crecimiento tumoral por IVIS y vemos cómo las células que expresan los factores de reprogramación presentan un menor crecimiento que el control (**Figura 28B**). Además, observamos la expresión del factor de reprogramación *Oct4* en tumores 4F, pero no en los procedentes del control (**FIGURA 29A**). También observamos la expresión de la proteína caspasa 3 cortada, indicativa de muerte celular, en tumores 4F, pero no en los procedentes del control (**FIGURA 29B**).

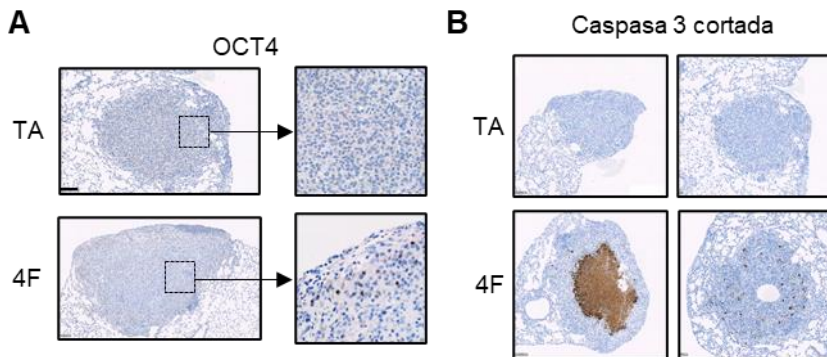


Figura 29. Expresión de factores de reprogramación y de marcadores de muerte celular en tumores procedentes de ratones TA y 4F por inmunohistoquímica. (A) Tinción para OCT4. (B) Tinción para caspasa 3 cortada.

Estos resultados indican que la expresión de los factores de reprogramación reduce el crecimiento tumoral de las células Cml57 y además activa procesos de muerte celular en estas células.

2.3. ENSAYOS DE PROGRESIÓN TUMORAL SOBRE TUMORES PULMONARES YA ESTABLECIDOS EN RATONES i4F/KRAS

En los ensayos anteriores estudiamos el efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre el proceso de iniciación tumoral. Esta vez, sin embargo, estudiaremos el efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre tumores ya establecidos. Para ello cruzamos

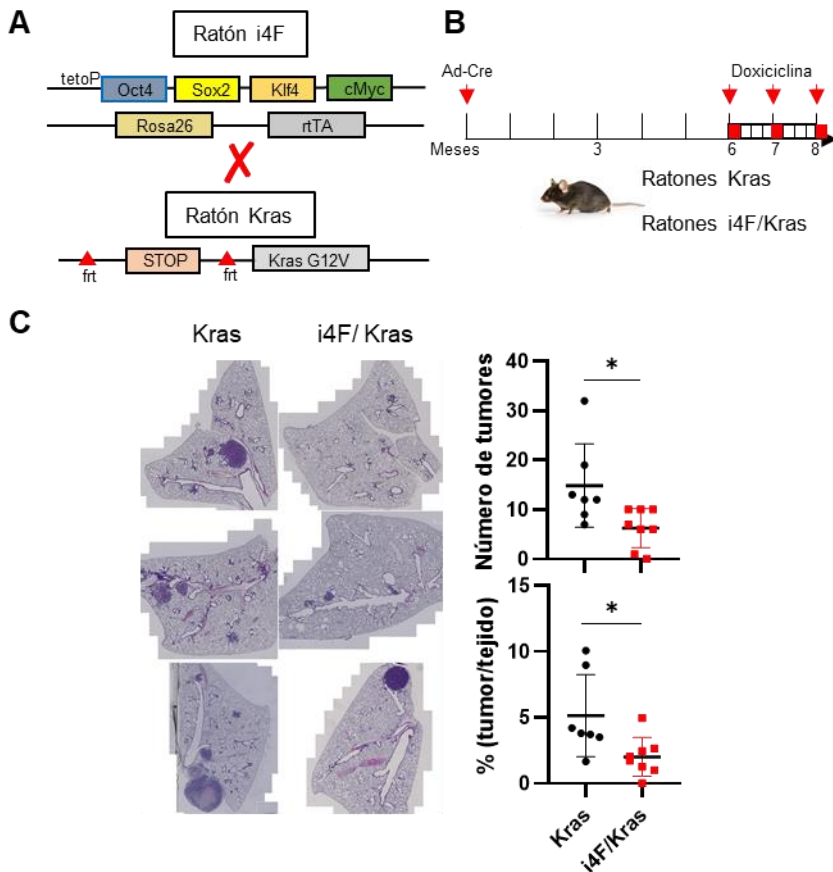


Figura 30. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación en tumores establecidos en ratones Kras e i4F/Kras. (A) Representación esquemática de las líneas de ratón utilizadas. (B) Representación esquemática del sistema empleado en los ensayos. (C) Imágenes representativas de los tumores pulmonares formados en ratones i4F/Kras y Kras (izquierda) y cuantificación por número de tumores y porcentaje de área tumoral (derecha). La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** P <0,001; ** P <0,01; * P <0,05.

dos líneas de ratones transgénicos: el ratón reprogramable (i4F) que porta en su genoma una construcción que permite la expresión de los factores de reprogramación en presencia de doxiciclina (Abad et al., 2013) y el ratón KrasV12-KI (Kras) que tras el tratamiento con la recombinasa Cre permite la expresión de una forma activa de Kras (KrasV12) desde su locus endógeno (Guerra et al., 2003), obteniendo ratones i4F/Kras. (**Figura 30A**).

En estos ratones (i4F/Kras) y en nuestro grupo control (Kras) administramos por vía intratraqueal adenovirus que expresan la recombinasa Cre (Ad-Cre) con el objetivo de activar la expresión de KrasV12 específicamente en el pulmón. La expresión de KrasV12 en pulmón provoca el desarrollo de adenomas (lesiones premalignas) que pueden llegar a convertirse en adenocarcinomas malignos (Collado et al., 2005; Guerra et al., 2003). Seis meses después de la activación de KrasV12 en pulmón a ambos grupos de ratones se les suministró doxiciclina en agua de bebida durante una semana y tras esto se les dejó tres semanas de descanso para prevenir la formación de teratomas. Este ciclo se repitió dos veces más y tras el tercer tratamiento con doxiciclina los ratones se sacrificaron para evaluar los tumores formados (**Figura 30B**). Observamos una reducción en el número de tumores en los ratones i4F/Kras que expresan los factores de reprogramación comparado con el control Kras que no los expresa, así como una reducción en la proporción tumor/tejido (**Figura 30C**).

También observamos un aumento en la expresión de los factores de reprogramación Klf4 y Oct4 en pulmones procedentes de ratones i4F/Kras comparado con el control (**Figura 31A**) así como la presencia de células caspasa 3 cortada positivas en los tumores procedentes de ratones i4F/Kras (**Figura 31B**).

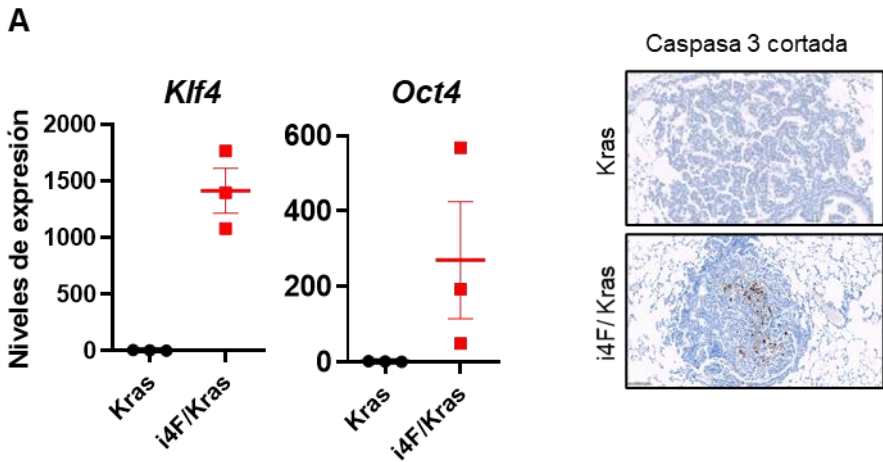


Figura 31. Expresión de factores de reprogramación y de marcadores de muerte celular en ratones *Kras* e *i4F/Kras*. **(A)** Niveles de expresión por qRT-PCR de los niveles de ARNm de *Klf4* y *Oct4*. **(B)** Tinción para caspasa 3 cortada. La significación estadística se calculó utilizando la prueba t de student, *** $P < 0,001$; ** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la expresión de los factores de reprogramación reduce la progresión tumoral durante las etapas iniciales de la formación del tumor y también es capaz de afectar a la progresión o viabilidad de tumores ya establecidos.

DISCUSIÓN

1. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación en células transformadas

1.1. REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS TRANSFORMADAS

La reprogramación celular se define como el proceso por el que una célula somática diferenciada adquiere características de célula madre embrionaria, convirtiéndose en una célula pluripotente con capacidad para formar células de las tres capas embrionarias. El desarrollo de una estrategia de reprogramación basada en el uso de una serie de factores definidos (Takahashi & Yamanaka, 2006) ha supuesto una revolución en el campo de la reprogramación celular, aumentando considerablemente el número de tipos celulares que se han logrado reprogramar con éxito. Sin embargo, la reprogramación de células tumorales sigue siendo un proceso poco eficiente. Los estudios en los que se han logrado reprogramar células transformadas son escasos y las iPSCs obtenidas presentan ciertas limitaciones, como la necesidad de la expresión continuada de los factores exógenos para el mantenimiento del estado pluripotente (Bernhardt et al., 2017; Kim et al., 2013, 2017) o una capacidad de diferenciación limitada (Jiang et al., 2013), entre otras.

Teniendo en cuenta esta información, intentamos reprogramar diferentes tipos de células transformadas. En células de fibrosarcoma de ratón, adenocarcinoma de ratón, A549 y MEFs transformados, introdujimos el plásmido Tet-O-FUW-OSKM, que permite la expresión de los factores de reprogramación en presencia de doxiciclina cuando se coinfecta con el plásmido FUW-M2rtTA, y tras 14 días analizamos la presencia de colonias de células iPS indicativas del éxito del proceso de reprogramación. Observamos que solo en el control positivo de reprogramación, constituido por MEFs *wt* no transformados, se habían formado colonias de iPSC, mientras que en ninguno de los tipos celulares transformados se observaron colonias. Estos resultados son coincidentes con lo observado en diversos estudios previos (Kim, 2020).

Además de la no reprogramación de estos tipos celulares transformados, observamos que durante el proceso de reprogramación estas células se veían afectadas negativamente y reducían su

crecimiento. Por este motivo decidimos estudiar el efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre células transformadas.

1.2. CARACTERIZAR EL EFECTO DE LA EXPRESIÓN DE LOS FACTORES DE REPROGRAMACIÓN EN CÉLULAS TRANSFORMADAS

Para estudiar el efecto de los factores de reprogramación en células transformadas utilizamos tanto células humanas, la línea celular A549, como células de ratón, MEFs transformados. Analizamos el efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre la capacidad proliferativa tanto a tiempos cortos, 3 días, como a tiempos largos, 14 días. En ambos casos observamos cómo la expresión de los factores de reprogramación reduce la capacidad proliferativa en ambos tipos celulares a tiempos cortos y cómo esta diferencia se mantiene a lo largo del tiempo. Sin embargo, el efecto en la reducción de la capacidad proliferativa es mayor en las células A549 que en los MEFs transformados. El sistema de transformación utilizado en MEFs, consistente en la falta de p53 y la expresión de la forma activa de Ras, HrasV12, ha demostrado ser funcional puesto que la inyección subcutánea de estas células en ratones inmunodeprimidos conllevó la formación de tumores. Sin embargo, estas células presentaban ciertas limitaciones a la hora de caracterizar aspectos fenotípicos propios de células tumorales como el crecimiento independiente de anclaje en los ensayos en agar blando. Debido a estas limitaciones, sumadas al mayor efecto en la reducción de la capacidad proliferativa observado en las células A549 y a que esta línea está estandarizada como modelo en multitud de ensayos, decidimos que nuestros siguientes ensayos se centrasen en las células A549.

Además de estudiar el efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre la capacidad proliferativa en células tumorales, decidimos estudiar cómo la expresión de los factores de reprogramación afecta a estructuras celulares complejas previamente establecidas. Para ello, sobre colonias de A549 previamente formadas en agar blando, indujimos la expresión de los factores de reprogramación y observamos cómo la expresión de los factores destruye estas estructuras celulares. Esto nos indica que los factores de reprogramación celular no solo

reducen la capacidad proliferativa de las células A549, sino que también promueven la destrucción de estructuras previamente formadas.

Un aspecto importante es determinar si el efecto de los factores de reprogramación es intrínseco, afecta a la propia célula que expresa los factores, o extrínseco, mediado por compuestos secretados por las células que expresan los factores y que afectan a otras células. Para ello realizamos tanto ensayos de cocultivo en *transwell*, como ensayos con medios condicionados en los que observamos que los factores solubles secretados por las células que expresan los factores de reprogramación no tienen ningún efecto sobre las células diana. Por lo tanto, el efecto de la expresión de los factores de reprogramación es intrínseco y no está mediado por factores solubles.

Una vez determinado el efecto negativo e intrínseco que la expresión de los factores de reprogramación tiene sobre las células A549, decidimos estudiar los mecanismos moleculares activados en respuesta a la expresión de los factores. Evaluamos marcadores moleculares de los principales procesos implicados en la regulación de la proliferación y la viabilidad celular; senescencia celular y apoptosis. En primer lugar, analizamos marcadores de senescencia celular, observando un aumento en la actividad de la enzima beta-galactosidasa, marcador clásico de senescencia, así como un aumento en la expresión de genes relacionados con el estado senescente como *CDKN1A*, *IL6* y *CXCL1*. Esto nos indica que la expresión de los factores de reprogramación provoca la entrada en senescencia de una parte de la población de células A549. Estudios previos han demostrado cómo la expresión de oncogenes induce senescencia, este proceso se denomina senescencia inducida por oncogenes (OIS, *Oncogene induce senescence*) (Collado & Serrano, 2010; Serrano et al., 1997). Los factores OSKM han sido descritos como oncogenes en diferentes tipos de cáncer, por ejemplo, Sox2 en carcinoma de pulmón (Beroukhi et al., 2010), Oct4 en carcinomas embrionarios (Gidekel et al., 2003), Klf4 en cáncer de piel (Rowland & Peeper, 2006) y c-Myc en diversos cánceres humanos (Beroukhi et al., 2010). Por lo tanto, el aumento de marcadores de senescencia en respuesta a la expresión de los factores de reprogramación coincide con lo observado en estudios previos (Banito et al., 2009).

También analizamos marcadores de apoptosis, observando un aumento en el número de células positivas para dos marcadores clásicos de apoptosis; la Anexina V, que se une a residuos de fosfatidilserina extracelulares indicativos de degradación de membranas, y caspasa 3 cortada, la forma activa de la caspasa 3 y uno de los principales efectores durante el proceso de apoptosis celular (Muzio et al., 1996; Varfolomeev et al., 1998). Además, observamos la activación del proceso de apoptosis en colonias celulares ya establecidas en agar blando al detectar la expresión del marcador caspasa 3 en la condición que expresa los factores de reprogramación, pero no en el control, lo que justificaría la reducción en el número de colonias en esta condición.

La importancia de la apoptosis en la respuesta a la expresión de los factores de reprogramación se confirmó con el tratamiento de las células A549 que expresan los factores de reprogramación con el inhibidor general de caspasas Z-VAD (Ome)-FMK, observando una recuperación parcial en la capacidad proliferativa. Por lo que confirmamos que la expresión de los factores de reprogramación en células de la línea A549 provoca su entrada en apoptosis. Estos resultados coinciden con un estudio publicado recientemente en el que se demuestra que la expresión de los factores de reprogramación produce la entrada en apoptosis de células de leucemia (Yajie Wang et al., 2019).

Además de analizar marcadores de senescencia y apoptosis, también analizamos el perfil de ciclo de la población celular. Observamos cómo la expresión de los factores de reprogramación produce una acumulación de células en las fases S y G2/M, que se correlaciona con un aumento en la forma hiperfosforilada e inactiva de pRB, descrito como uno de los principales mediadores en el arresto celular en la fase G1 del ciclo (Helin, 1998), y una bajada en la ciclina E, que alcanza sus niveles máximos de expresión en la transición de la fase G1 a la fase S.

Esta acumulación de células en las fases S y G2/M va acompañada de un aumento en marcadores de daño en el ADN, como la fosfo-histona- γ H2X, por lo que interpretamos que este aumento de células no es consecuencia de una mayor capacidad proliferativa de las células que expresan los factores de reprogramación, sino que es debido a que

estas células presentan mayores dificultades para progresar en el ciclo al presentar unos niveles más altos de daño en el ADN, por lo que se quedan retenidas en los puntos de control de ciclo existentes en las fases S y G2/M. Esta hipótesis demostraría también que, pese a que las células que no expresan los factores de reprogramación presentan una mayor proporción de células en fase G1, la proporción de células senescentes, caracterizadas por el arresto del ciclo celular en la fase G1 y cuyo programa puede ser activado en respuesta al daño persistente en el ADN, es mayor en las células A549 que expresan los factores de reprogramación que en las A549 control. Además, se ha descrito cómo las células dañadas son retenidas en los diversos puntos de control existentes en las diferentes fases del ciclo celular con el objetivo de repararlas. Si el daño es muy elevado se retirarían definitivamente del ciclo entrando en senescencia o apoptosis.

En base a los resultados observados, podemos confirmar que la expresión conjunta de los factores de reprogramación en células de la línea A549 produce un aumento en los niveles de daño en el ADN, generando la entrada de las células en senescencia o apoptosis.

Una vez determinados los mecanismos moleculares que se activan en respuesta a la expresión de los factores de reprogramación en las células A549, decidimos analizar qué vías podrían ser las responsables de mediar en dicho efecto. Una de las principales vías activadas en respuesta al daño en el ADN es la de p53/p21. Se ha descrito cómo esta vía media en la entrada en senescencia o apoptosis de células con daño irreparable (Gartel, 2005; Hu et al., 2012; D. P. Lane, 1992). Además, se ha descrito cómo el factor de reprogramación Klf4 media en la activación de p21 en diversos contextos. Por ejemplo, la sobreexpresión de Klf4 produce la activación de p21 y la parada proliferativa en células en cultivo (Rowland et al., 2005), células del epitelio gástrico de ratones deficientes para Klf4 expresan niveles bajos de p21 (Katz et al., 2005) o células derivadas de algunos tumores caracterizadas por presentar mutaciones delectivas en Klf4 y otros miembros de la familia como Klf6 son deficientes para activar la parada en el ciclo celular mediada por p21 (Narla et al., 2001; Zhao et al., 2004). Por estos motivos, sumados al aumento observado en su expresión en células A549 que expresan los factores, consideramos que p21 puede ser un buen

candidato para mediar en la respuesta a la expresión de los factores de reprogramación en las células A549.

Para estudiar el papel de p21 en la respuesta de las células A549 a la expresión de los factores de reprogramación, utilizamos un sistema de inhibición basado en la introducción del plásmido LT3-GEPIR-*shp21*, que codifica para un *shp21* que reduce la expresión de p21. Analizamos el efecto de la bajada de p21 en células que expresan los factores de reprogramación y observamos una recuperación considerable en la capacidad proliferativa, así como una reducción en marcadores de senescencia y apoptosis en las células que expresan conjuntamente el *shp21* y los factores de reprogramación comparado con aquellas que solo expresan los factores de reprogramación. La recuperación en la capacidad proliferativa no es total, pero se acerca a la observada en células A549 normales. Del mismo modo, la reducción en marcadores de senescencia y apoptosis, pese acercarse a los valores basales que presentan las A549, tampoco se iguala. Estos resultados podrían ser consecuencia de que el sistema utilizado para inactivar p21 no sea del todo eficiente. De hecho, observamos cómo la expresión del *shp21* reduce los niveles de p21, pero estos se mantienen todavía por encima de los valores basales observados en células A549 normales.

En conjunto, estos ensayos demuestran el papel activo de p21 como mediador en la respuesta al daño producido por la expresión de los factores de reprogramación, lo que justifica la acumulación de células en las fases S y G2/M y el aumento de células apoptóticas y senescentes, puesto que se ha descrito la participación de p21 en todos estos procesos (Bertoli et al., 2013; B. D. Chang et al., 2000; Choi et al., 2014; Gartel, 2005; Yingcai Wang et al., 1999). La recuperación parcial de la capacidad proliferativa, y de los marcadores de senescencia y apoptosis puede ser debida a que el sistema utilizado para la inhibición de p21 no sea completamente eficiente, que existan algunas otras vías independientes de p21 que medien en la respuesta de la expresión de los factores de reprogramación en células A549 o una combinación de ambas.

1.3. CARACTERIZAR EL EFECTO DE LA EXPRESIÓN INDIVIDUAL DE LOS FACTORES DE REPROGRAMACIÓN EN CÉLULAS TRANSFORMADAS

Una vez analizado el efecto, los mecanismos y las vías activadas por la expresión conjunta de los factores de reprogramación en las células A549, decidimos estudiar la contribución individual de cada uno de los factores de reprogramación. Para ello, en primer lugar introdujimos vectores retrovirales que expresan individualmente los factores de reprogramación: pMXs-Oct4, -Sox2, -Klf4 y -c-Myc, en células A549. Además, introdujimos un plásmido que expresa GFP como control negativo, puesto que su expresión es inocua para las células A549, y como control positivo utilizamos el vector lentiviral policistrónico inducible por doxiciclina utilizado en los ensayos anteriores.

Analizamos el efecto sobre la capacidad proliferativa y observamos tres grupos claramente diferenciados: el grupo formado por el control negativo de células que expresan GFP, las células que expresan Sox2 y las células que expresan Myc, que no presentan afectada su capacidad proliferativa. Un grupo formado por las células que expresan Klf4, Oct4 y la combinación de OSKM utilizando vectores retrovirales, que presentan una reducción intermedia en su capacidad proliferativa. Y finalmente, el grupo formado por las células que expresan en conjunto los factores de reprogramación utilizando el vector lentiviral, que presenta el mayor efecto en la reducción de la capacidad proliferativa. Los resultados observados nos llevan a pensar que quizás la diferencia existente entre la combinación de OSKM retroviral y lentiviral sea consecuencia de la eficiencia que los vectores tienen para expresar los factores de reprogramación, es decir, quizás sea debido a que el vector lentiviral permite obtener unos niveles de expresión de los factores superiores a los obtenidos con los vectores retrovirales. Por ello consideramos que quizás el efecto de los factores de reprogramación sobre las células A549 puede ser dosis dependiente.

Para evaluar si el efecto de la expresión de los factores de reprogramación en células A549 es dosis dependiente utilizamos el plásmido lentiviral policistrónico inducible por doxiciclina. Regulando los niveles de doxiciclina añadidos al medio de cultivo podemos regular los niveles de expresión de los factores de reprogramación. Observamos cómo a dosis crecientes de doxiciclina el efecto sobre la reducción de

la capacidad proliferativa en células A549 es mayor y se correlaciona con mayores niveles de expresión de los factores de reprogramación hasta que se alcanza el nivel máximo que permite el sistema. Se evaluó además cómo las dosis de doxiciclina utilizadas no afectaban a la capacidad proliferativa de las A549. Estos resultados demuestran el efecto dosis dependiente de los factores de reprogramación en células A549 y justificarían las diferencias observadas en el efecto de los vectores retrovirales y lentivirales.

Una vez demostrado el efecto dosis dependiente de los factores de reprogramación decidimos utilizar un sistema de expresión individual de los factores con el que nos asegurásemos alcanzar unos niveles lo más próximos posibles a los obtenidos con el vector lentiviral policistrónico Tet-O-FUW-OSKM. Para ello utilizamos los vectores lentivirales TetO-FUW -Oct4, -Sox2, -Klf4 y c-Myc, que utilizan el mismo *backbone* que el policistrónico utilizado en los ensayos de expresión conjunta y que nos permiten obtener unos niveles de expresión prácticamente iguales.

Evaluamos el efecto sobre la capacidad proliferativa de la expresión individual de los factores utilizando estos vectores y observamos unos resultados muy similares a los observados en los ensayos con los vectores retrovirales. Las células que expresan individualmente Klf4 y Oct4 presentan una reducción en su capacidad proliferativa, pero en este caso la reducción es tan fuerte como la observada en las células que expresan conjuntamente los factores de reprogramación. Además, este efecto se correlaciona con un aumento en los marcadores de senescencia y apoptosis muy similares en ambos casos a los observados con la expresión conjunta de los factores, mientras que en el caso de las células que expresan Sox2 y Myc los niveles de expresión son prácticamente idénticos a los del control, constituido por células que no expresan los factores de reprogramación. Estos resultados parecen indicar que el efecto negativo de la expresión de los factores de reprogramación en células A549 está producido por Klf4 y Oct4, mientras que la expresión de los factores Sox2 y Myc no parece afectar a estas células.

Recientemente se ha descrito cómo la expresión individual de Klf4 promueve la entrada en apoptosis de células de leucemia (Yajie Wang

et al., 2019). Sin embargo, el efecto negativo de la expresión de Oct4 en células tumorales no había sido descrito. Del mismo modo, algunos artículos describen cómo la expresión de Sox2 en células de leucemia (Yajie Wang et al., 2019) afecta negativamente a su viabilidad y capacidad proliferativa, lo que demuestra la heterogeneidad existente dentro de las células transformadas pese a presentar aspectos fenotípicos comunes y la necesidad de estudiar individualmente cada tipo celular transformado.

Decidimos evaluar también si el efecto observado en la expresión individual de los factores está mediado por p21. Para ello utilizamos el mismo sistema de inhibición de p21 que en ensayos anteriores. En primer lugar, observamos cómo se produce un aumento en los niveles de p21, similar al producido por la expresión conjunta de los factores, en células que expresan individualmente Oct4 o Klf4. También observamos cómo la reducción de p21 permite la recuperación parcial de la capacidad proliferativa perdida en células A549 que expresan individualmente Oct4 o Klf4, resultado muy similar al observado previamente en células que expresan conjuntamente los factores de reprogramación. Esta recuperación parcial se observa también para los marcadores de senescencia y apoptosis. Se ha descrito cómo Klf4 interacciona directamente con p21 activando su expresión (Katz et al., 2005; Rowland et al., 2005; Zhao et al., 2004). Sin embargo, en el caso de Oct4 se ha descrito lo opuesto, cómo esta proteína puede inactivar la expresión de p21 mediante interacción directa (J. Lee et al., 2010; Tsai et al., 2012; Zhen et al., 2012). Los niveles de p21 observados en ambos grupos celulares son muy similares, por lo que interpretamos que la activación de p21 no se produce por interacción directa entre estas proteínas y el locus que codifica para p21, puesto que sus papeles son antagónicos a la hora de regular los niveles de esta proteína y no justificaría los niveles de p21 observados. El hecho de que el efecto esté mediado por ambos factores y que se detecte un aumento en marcadores de daño en el ADN refuerza la hipótesis de que el aumento de p21 se produce en respuesta a un aumento en el daño en ADN producido por la expresión de Oct4 y Klf4, y la consiguiente entrada en senescencia o apoptosis de las células dañadas irreversiblemente. Del mismo modo que sucede cuando se expresan conjuntamente los factores y se inhibe

p21, la recuperación en la capacidad proliferativa y en los marcadores de senescencia y apoptosis no es completa. Esto puede ser debido a que el sistema utilizado para la inhibición de p21 no sea completamente eficiente, que existan algunas otras vías independientes de p21 que medien en la respuesta al daño producida por la expresión de los factores de reprogramación en células A549 o una combinación de ambas. En el caso de las células que expresan Myc o Sox2, los niveles de p21 no se ven afectados y la inhibición de p21 no produce ningún efecto sobre los marcadores analizados ni sobre la viabilidad celular.

2. Efecto de la expresión de los factores de reprogramación celular sobre la progresión tumoral *in vivo*

Tras la caracterización del efecto de los factores de reprogramación en cultivos celulares, decidimos estudiar el efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre la progresión tumoral. En nuestro caso nos centramos en el estudio de tumores sólidos. Esta es una perspectiva novedosa puesto que los estudios previos en este campo, además de ser muy escasos, se centran en el estudio de tumores líquidos, principalmente en algunos tipos de leucemia (Yajie Wang et al., 2019). Para ello estudiamos tres tipos de sistemas distintos.

En primer lugar, utilizamos ratones *nude* a los que inyectamos subcutáneamente células A549 que portan la construcción con los factores de reprogramación y el rtTA, de modo que en presencia de doxiciclina estas células expresarán los factores de reprogramación (condición 4F, inyectadas en el flanco derecho) y células que solo portan el rtTA como control, por lo que en presencia de doxiciclina no expresarán los factores de reprogramación (condición TA, inyectadas en el flanco izquierdo). Además, ambos grupos celulares portan una construcción que expresa la enzima luciferasa y que nos permitirá analizar el crecimiento tumoral por emisión de fluorescencia cuando los ratones son tratados con luciferina. Observamos cómo las células que expresan los factores de reprogramación presentan mayores dificultades para desarrollar tumores. Sin embargo, las diferencias entre

los grupos se reducen con el paso del tiempo perdiendo significación estadística durante la tercera y la cuarta semana. Pese a que las diferencias se reducen, la tendencia muestra cómo los tumores que expresan los factores de reprogramación presentan mayores dificultades para crecer, manteniéndose el tamaño promedio del tumor muy por debajo del observado en el grupo control. El aumento en el crecimiento en alguno de los tumores del grupo 4F en las últimas medidas podría ser consecuencia de una selección de aquellas células que no portan la construcción que permite la expresión de los factores de reprogramación. Una de las principales limitaciones de este experimento es que los vectores utilizados no permiten la selección de las células que los portan. Por lo tanto, pese a tener unas eficiencias de infección altas, existen células que han sido inyectadas y que no expresan los factores de reprogramación. Como hemos demostrado en apartados anteriores, la expresión de los factores de reprogramación reduce el crecimiento en células A549, por lo que, las células que no han captado la construcción se verán favorecidas y podrán crecer. Por este motivo, aquellos tumores del grupo 4F que estén estocásticamente enriquecidos en células que no porten la construcción con los factores de reprogramación verán favorecido su crecimiento a lo largo del tiempo. Esto también podría explicar la gran variabilidad observada dentro del grupo de tumores 4F, en el que vemos dos grupos de tumores bien diferenciados; unos muy grandes y otros muy pequeños, mientras que en el caso de los tumores TA presentan también variabilidad, pero más reducida y continuada.

En otro de los modelos, utilizamos ratones C57BL/6 a los que inyectamos en vena de cola células Cml57 que metastatizarán en pulmón formando tumores. El sistema es el mismo que en el modelo anterior, dos grupos: uno que porta la construcción con los factores de reprogramación y el rtTA (condición 4F) y otro como control (condición TA) con células que portan el rtTA. La diferencia es que en este caso podemos seleccionar aquellas células que portan los factores de reprogramación gracias a que la construcción va acoplada a una proteína naranja fluorescente (mOrange) y el rtTA porta un gen de resistencia al antibiótico puromicina. Además, igual que en el sistema anterior, ambos grupos celulares portan una construcción que expresa

la enzima luciferasa y que nos permitirá analizar el crecimiento tumoral por emisión de fluorescencia cuando los ratones son tratados con luciferina. Observamos cómo los tumores del grupo 4F presentan mayores dificultades para crecer, lo que demuestra que la posibilidad de obtener un cultivo celular que en su totalidad presente la construcción con los factores de reprogramación elimina la pérdida del efecto restrictivo observada en el modelo anterior durante las últimas medidas, por lo que la explicación de no partir de un cultivo puro con todas las células portando la construcción podría justificar los resultados obtenidos. Además, observamos una correlación entre la expresión de Oct4 y la expresión de caspasa 3 cortada, lo que demuestra que la expresión de los factores de reprogramación activa el programa de apoptosis *in vivo*, como hemos demostrado previamente que sucedía en sistemas *in vitro*. Esto podría justificar la mayor dificultad que presentan los tumores de la condición 4F para crecer comparados con el control.

En los dos primeros modelos estudiamos cómo el efecto de la expresión de los factores de reprogramación afecta a la progresión tumoral desde el inicio, es decir, tras la inyección subcutánea o en vena de cola se suministró doxiciclina en agua de bebida. En el último modelo nos centramos en estudiar el efecto de la expresión de los factores de reprogramación sobre tumores ya establecidos. Para ello cruzamos dos líneas de ratones transgénicos: el ratón reprogramable (i4F) que porta en su genoma una construcción que permite la expresión de los factores de reprogramación en presencia de doxiciclina (Abad et al., 2013) y el ratón KrasV12-KI (Kras) que tras el tratamiento con la recombinasa Cre permite la expresión de una forma activa de Kras (KrasV12) (Guerra et al., 2003), obteniendo ratones i4F/Kras. En estos ratones (i4F/Kras) y en nuestro grupo control (Kras) administramos por vía intratraqueal adenovirus que expresan la recombinasa Cre (Ad-Cre) con el objetivo de activar la expresión de KrasV12 específicamente en el pulmón. La expresión de KrasV12 en pulmón provoca el desarrollo de adenomas (lesiones premalignas) que pueden llegar a convertirse en adenocarcinomas malignos (Collado et al., 2005; Guerra et al., 2003). Seis meses después de la activación de KrasV12 en pulmón a ambos grupos de ratones se les suministró doxiciclina en agua de bebida

durante una semana y tras esto se les dejó tres semanas de descanso para prevenir la formación de teratomas. Este ciclo se repitió dos veces y tras la tercera puesta de doxiciclina los ratones se sacrificaron para evaluar los tumores formados. Observamos una reducción en el número de tumores en los ratones que expresan los factores de reprogramación, acompañada de una correlación en la expresión de Oct4 y Klf4 con el marcador indicativo de apoptosis caspasa 3 cortada. Estos resultados demuestran que la expresión de los factores de reprogramación elimina tumores ya establecidos e induce apoptosis en las células tumorales *in vivo*. Sin embargo, en estos tumores no se detectó un aumento en los niveles de p21, como sí observábamos en los ensayos con células en cultivo, en los que p21 parecía ser uno de los principales mediadores en la respuesta a la expresión de los factores de reprogramación y su inhibición revertía parcialmente el efecto negativo observado en las células tumorales utilizadas. Esto puede ser debido a que el tipo celular utilizado en la caracterización en los ensayos con células, la línea de células humanas A549, difiere de las células de ratón de las que derivan los tumores evaluados en este último modelo o bien porque las vías moleculares que median en la respuesta a la expresión de los factores de reprogramación *in vivo* e *in vitro* sean distintas.

En conjunto, los resultados de los tres modelos *in vivo* utilizados demuestran que la expresión de los factores de reprogramación afecta negativamente a la progresión tumoral, tanto desde su inicio, como observamos en los dos primeros modelos, como sobre tumores ya establecidos. Hemos demostrado también cómo la expresión de los factores de reprogramación induce apoptosis en tumores. Este resultado coincide con lo observado *in vitro* en la línea A549. Sin embargo, es necesario profundizar en los mecanismos activados en respuesta a la expresión de los factores de reprogramación en los modelos *in vivo* utilizados. *In vitro* parece que p21 juega un papel importante en la respuesta a la expresión de los factores. No obstante, en los modelos de progresión tumoral no hemos detectado un aumento para este marcador. Además, en los ensayos *in vitro* hemos demostrado cómo la expresión de los factores de reprogramación promueve la entrada en senescencia de parte del cultivo de A549, por lo que evaluar marcadores de

senescencia y seguir caracterizando los mecanismos y vías moleculares activadas en los modelos tumorales *in vivo* es necesario.

CONCLUSIONES

1. Hemos demostrado en diferentes células transformadas que la inducción de pluripotencia por reprogramación con factores genéticos definidos de estos tipos celulares es un proceso muy poco eficiente.
2. La expresión de los factores de reprogramación reduce la viabilidad de células transformadas, tanto de ratón como humanas.
3. La expresión de los factores de reprogramación destruye las colonias previamente formadas por las células A549.
4. La expresión de los factores de reprogramación activa los procesos de apoptosis y senescencia celular, acompañados por un aumento en el daño al ADN en la línea celular A549.
5. El efecto negativo sobre la línea celular A549 causado por la expresión de los factores de reprogramación es un proceso endógeno y no está mediado por factores solubles.
6. La reducción de los niveles del inhibidor de CDKs p21 en células que expresan los factores de reprogramación recupera parcialmente la viabilidad celular y revierte de manera significativa el aumento observado en los marcadores de senescencia y apoptosis celular.
7. El efecto negativo sobre la línea celular A549 causado por la expresión de los factores de reprogramación es dosis dependiente.
8. Los factores de reprogramación responsables de reducir la viabilidad celular en las células A549 son *Oct4* y *Klf4*, mientras que la expresión de *Sox2* y *Myc* no parece afectar negativamente a las células.
9. La expresión individual de los factores de reprogramación *Oct4* y *Klf4* activa los procesos de apoptosis y senescencia en la línea celular A549, recapitulando lo observado con la expresión conjunta de los cuatro factores.
10. La reducción de los niveles de p21 junto a la expresión individual de los factores *Oct4* y *Klf4* revierte parcialmente el aumento en marcadores de senescencia y apoptosis causado por estos factores de reprogramación.
11. La expresión de los factores de reprogramación reduce la capacidad de formación de tumores de las células A549 y Cml57 cuando son inyectadas en ratón y activa procesos de apoptosis celular.
12. La expresión de los factores de reprogramación reduce el número de tumores previamente establecidos en un modelo de cáncer

de pulmón dirigido por la expresión del oncogén activo Kras y activa procesos de apoptosis celular.

BIBLIOGRAFÍA

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

Alcaraz, N. Identification of senescence-associated IL6 as a key component for cellular reprogramming. (2020). Tesis doctoral. UAM. <http://hdl.handle.net/10486/691950>

Adrain, C., Slee, E. A., Harte, M. T., & Martin, S. J. (1999). Regulation of apoptotic protease activating factor-1 oligomerization and apoptosis by the WD-40 repeat region. *The Journal of Biological Chemistry*, *274*(30), 20855–20860.

Alimonti, A., Nardella, C., Chen, Z., Clohessy, J. G., Carracedo, A., Trotman, L. C., Cheng, K., Varmeh, S., Kozma, S. C., Thomas, G., Rosivatz, E., Woscholski, R., Cognetti, F., Scher, H. I., & Pandolfi, P. P. (2010). A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, *120*(3), 681–693.

Apostolou, E., & Hochedlinger, K. (2013). Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature*, *502*(7472), 462–471.

Ardhanareeswaran, K., Mariani, J., Coppola, G., Abyzov, A., & Vaccarino, F. M. (2017). Human induced pluripotent stem cells for modelling neurodevelopmental disorders. *Nature Reviews. Neurology*, *13*(5), 265–278.

Ashkenazi, A., & Dixit, V. M. (1998). Death receptors: signaling and modulation. *Science (New York, N.Y.)*, *281*(5381), 1305–1308.

Baar, M. P., Brandt, R. M. C., Putavet, D. A., Klein, J. D. D., Derks, K. W. J., Bourgeois, B. R. M., Stryeck, S., Rijksen, Y., van Willigenburg, H., Feijtel, D. A., van der Pluijm, I., Essers, J., van Cappellen, W. A., van IJcken, W. F., Houtsmuller, A. B., Pothof, J., de Bruin, R. W. F., Madl, T., Hoeijmakers, J. H. J., ... de Keizer, P. L. J. (2017). Targeted Apoptosis of Senescent Cells Restores Tissue Homeostasis in Response to Chemotoxicity and Aging. *Cell*, *169*(1), 132-147.e16.

Baker, D. J., Childs, B. G., Durik, M., Wijers, M. E., Sieben, C. J., Zhong, J., A. Saltness, R., Jeganathan, K. B., Verzosa, G. C., Pezeshki, A., Khazaie, K., Miller, J. D., & Van Deursen, J. M. (2016). Naturally occurring p16(Ink4a)-positive cells shorten healthy lifespan. *Nature*, *530*(7589), 184–189.

Banito, A., Rashid, S. T., Acosta, J. C., Li, S. De, Pereira, C. F., Geti, I., Pinho, S., Silva, J. C., Azuara, V., Walsh, M., Vallier, L., & Gil, J. (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes & Development*, *23*(18), 2134–2139.

Baptista, L. S., Kronemberger, G. S., Côrtes, I., Charelli, L. E., Matsui, R. A. M., Palhares, T. N., Sohler, J., Rossi, A. M., & Granjeiro, J. M. (2018). Adult Stem Cells Spheroids to Optimize Cell Colonization in Scaffolds for Cartilage and Bone Tissue Engineering. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(5).

Bartkova, J., Lukas, J., Guldborg, P., Alsnér, J., Kirkin, A. F., Zeuthen, J., & Bartek, J. (1996). The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis. *Cancer Research*, *56*(23), 5475–5483.

Bass, A. J., Watanabe, H., Mermel, C. H., Yu, S., Perner, S., Verhaak, R. G., Kim, S. Y., Wardwell, L., Tamayo, P., Gat-Viks, I., Ramos, A. H., Woo, M. S., Weir, B. A., Getz, G., Beroukhim, R., O’Kelly, M., Dutt, A., Rozenblatt-Rosen, O., Dziunycz, P., ... Meyerson, M. (2009). SOX2 is an amplified lineage-survival oncogene in lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Nature Genetics*, *41*(11), 1238–1242.

Bassaneze, V., Miyakawa, A. A., & Krieger, J. E. (2008). A quantitative chemiluminescent method for studying replicative and stress-induced premature senescence in cell cultures. *Analytical Biochemistry*, *372*(2), 198–203.

Bernhardt, M., Novak, D., Assenov, Y., Orouji, E., Knappe, N., Weina, K., Reith, M., Larribere, L., Gebhardt, C., Plass, C., Umansky, V., & Utikal, J. (2017). Melanoma-Derived iPCCs Show Differential Tumorigenicity and Therapy Response. *Stem Cell Reports*, *8*(5), 1379–1391.

Beroukhim, R., Mermel, C. H., Porter, D., Wei, G., Raychaudhuri, S., Donovan, J., Barretina, J., Boehm, J. S., Dobson, J., Urashima, M., McHenry, K. T., Pinchback, R. M., Ligon, A. H., Cho, Y. J., Haery, L., Greulich, H., Reich, M., Winckler, W., Lawrence, M. S., ... Meyerson, M. (2010). The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature*, *463*(7283), 899–905.

Bertoli, C., Skotheim, J. M., & De Bruin, R. A. M. (2013). Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *14*(8), 518–528.

cell cycle regulators and beyond. *Developmental Cell*, 14(2), 159–169.

Besson, A., Gurian-West, M., Chen, X., Kelly-Spratt, K. S., Kemp, C. J., & Roberts, J. M. (2006). A pathway in quiescent cells that controls p27Kip1 stability, subcellular localization, and tumor suppression. *Genes & Development*, 20(1), 47–64.

Bloom, J., & Cross, F. R. (2007). Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(2), 149–160.

Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C. P., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., & Wright, W. E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science (New York, N.Y.)*, 279(5349), 349–352.

Brady, C. A., & Attardi, L. D. (2010). p53 at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(Pt 15), 2527–2532.

Buganim, Y., Faddah, D. A., Cheng, A. W., Itskovich, E., Markoulaki, S., Ganz, K., Klemm, S. L., Van Oudenaarden, A., & Jaenisch, R. (2012). Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell*, 150(6), 1209–1222.

Burkhart, D. L., & Sage, J. (2008). Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nature Reviews. Cancer*, 8(9), 671–682.

Carey, B. W., Markoulaki, S., Hanna, J., Saha, K., Gao, Q., Mitalipova, M., & Jaenisch, R. (2009). Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America, 106(1), 157–162.

Chang, B. D., Watanabe, K., Broude, E. V., Fang, J., Poole, J. C., Kalinichenko, T. V., & Roninson, I. B. (2000). Effects of p21Waf1/Cip1/Sdi1 on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(8), 4291–4296.

Chang, J., Wang, Y., Shao, L., Laberge, R. M., Demaria, M., Campisi, J., Janakiraman, K., Sharpless, N. E., Ding, S., Feng, W., Luo, Y., Wang, X., Aykin-Burns, N., Krager, K., Ponnappan, U., Hauer-Jensen, M., Meng, A., & Zhou, D. (2016). Clearance of senescent cells by ABT263 rejuvenates aged hematopoietic stem cells in mice. *Nature Medicine*, 22(1), 78–83.

Chapman, J., Fielder, E., & Passos, J. F. (2019). Mitochondrial dysfunction and cell senescence: deciphering a complex relationship. *FEBS Letters*, 593(13), 1566–1579. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13498>

Chen, Y., & Poon, R. Y. C. (2008). The multiple checkpoint functions of CHK1 and CHK2 in maintenance of genome stability. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 13(13), 5016–5029.

Chiche, A., Le Roux, I., von Joest, M., Sakai, H., Aguin, S. B., Cazin, C., Salam, R., Fiette, L., Alegria, O., Flamant, P., Tajbakhsh, S., & Li, H. (2017). Injury-Induced Senescence Enables In Vivo Reprogramming in Skeletal Muscle. *Cell Stem Cell*, 20(3), 407-414.e4.

Chien, Y., & White, M. A. (2003). RAL GTPases are linchpin modulators of human tumour-cell proliferation and survival. *EMBO Reports*, 4(8), 800–806.

Childs, B. G., Baker, D. J., Wijshake, T., Conover, C. A., Campisi, J., & Van Deursen, J. M. (2016). Senescent intimal foam cells are deleterious at all stages of atherosclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 354(6311), 472–477.

Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & Van Deursen, J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature Medicine*, 21(12), 1424–1435.

Choi, W. Il, Kim, M. Y., Jeon, B. N., Koh, D. I., Yun, C. O., Li, Y., Lee, C. E., Oh, J., Kim, K., & Hur, M. W. (2014). Role of promyelocytic leukemia zinc finger (PLZF) in cell proliferation and cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21WAF/CDKN1A) gene repression. *The Journal of Biological Chemistry*, 289(27), 18625–18640.

Cobrinik, D. (2005). Pocket proteins and cell cycle control. *Oncogene*, 24(17), 2796–2809.

Cobrinik, D., Lee, M. H., Hannon, G., Mulligan, G., Bronson, R. T., Dyson, N., Harlow, E., Beach, D., Weinberg, R. A., & Jacks, T. (1996). Shared role of the pRB-related p130 and p107 proteins in limb development. *Genes & Development*, 10(13), 1633–1644.

Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *The Biochemical Journal*, 326 (Pt 1)(Pt 1), 1–16.

Barradas, M., Benguría, A., Zaballos, A., Flores, J. M., Barbacid, M., Beach, D., & Serrano, M. (2005). Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature*, *436*(7051), 642.

Collado, M., & Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature Reviews. Cancer*, *10*(1), 51–57.

Coppé, J. P., Patil, C. K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D. P., Goldstein, J., Nelson, P. S., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biology*, *6*(12).

Cox, A. D., & Der, C. J. (2010). Ras history: The saga continues. *Small GTPases*, *1*(1), 2–27.

Creagh, E. M., Conroy, H., & Martin, S. J. (2003). Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunological Reviews*, *193*, 10–21.

D’Adda Di Fagagna, F. (2008). Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nature Reviews. Cancer*, *8*(7), 512–522.

D’Adda Di Fagagna, F., Reaper, P. M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N. P., & Jackson, S. P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature*, *426*(6963), 194–198.

Darmon, A. J., Ley, T. J., Nicholson, D. W., & Bleackley, R. C. (1996). Cleavage of CPP32 by granzyme B represents a critical role for

granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(36), 21709–21712.

Dawson, M. A., & Kouzarides, T. (2012). Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. *Cell*, 150(1), 12–27.

Demaria, M., O’Leary, M. N., Chang, J., Shao, L., Liu, S., Alimirah, F., Koenig, K., Le, C., Mitin, N., Deal, A. M., Alston, S., Academia, E. C., Kilmarx, S., Valdovinos, A., Wang, B., De Bruin, A., Kennedy, B. K., Melov, S., Zhou, D., ... Campisi, J. (2017). Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discovery*, 7(2), 165–176.

Demaria, M., Ohtani, N., Youssef, S. A., Rodier, F., Toussaint, W., Mitchell, J. R., Laberge, R. M., Vijg, J., VanSteeg, H., Dollé, M. E. T., Hoeijmakers, J. H. J., deBruin, A., Hara, E., & Campisi, J. (2014). An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Developmental Cell*, 31(6), 722–733.

Desbordes, S. C., & Studer, L. (2013). Adapting human pluripotent stem cells to high-throughput and high-content screening. *Nature Protocols*, 8(1), 111–130.

Devault, A., Cavadore, J. C., Fesquet, D., Labbe, J. C., Lorca, T., Picard, A., Strausfeld, U., & Doree, M. (1991). Concerted roles of cyclin A, cdc25+ mitotic inducer, and type 2A phosphatase in activating the cyclin B/cdc2 protein kinase at the G2/M phase transition. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 56, 503–513.

Di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., & d’Adda di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: from mechanisms to

therapeutic opportunities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 22(2), 75–95.

Dick, F. A., & Rubin, S. M. (2013). Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(5), 297–306.

Dimri, G. P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E. E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., Peacocke, M., & Campisi, J. (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(20), 9363–9367.

Downward, J., Riehl, R., Ling, W. U., & Weinberg, R. A. (1990). Identification of a nucleotide exchange-promoting activity for p21ras. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(15), 5998–6002.

DR, G., & JC, R. (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science (New York, N.Y.)*, 281(5381), 118.

E, H., R, S., D, P., H, T., S, S., & G, P. (1996). Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Molecular and Cellular Biology*, 16(3), 859–867.

Earnshaw, W. C., Martins, L. M., & Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 383–424.

Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*, *75*(4), 817–825.

Eminli, S., Foudi, A., Stadtfeld, M., Maherali, N., Ahfeldt, T., Mostoslavsky, G., Hock, H., & Hochedlinger, K. (2009). Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nature Genetics*, *41*(9), 968–976.

Ewen, M. E., Xing, Y., Lawrence, J. B., & Livingston, D. M. (1991). Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein. *Cell*, *66*(6), 1155–1164.

Fero, M. L., Rivkin, M., Tasch, M., Porter, P., Carow, C. E., Firpo, E., Polyak, K., Tsai, L. H., Broudy, V., Perlmutter, R. M., Kaushansky, K., & Roberts, J. M. (1996). A syndrome of multiorgan hyperplasia with features of gigantism, tumorigenesis, and female sterility in p27(Kip1)-deficient mice. *Cell*, *85*(5), 733–744.

Ferreirós, A., Pedrosa, P., Da Silva-Álvarez, S., Triana-Martínez, F., Vilas, J. M., Picallos-Rabina, P., González, P., Gómez, M., Li, H., García-Caballero, T., González-Barcia, M., Vidal, A., & Collado, M. (2019). Context-Dependent Impact of RAS Oncogene Expression on Cellular Reprogramming to Pluripotency. *Stem Cell Reports*, *12*(5), 1099–1112.

Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E. S., Leitner, W. W., Robert, E. G., Catez, F., Smith, C. L., & Youle, R. J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Developmental Cell*, *1*(4), 515–525.

Freund, A., Orjalo, A. V., Desprez, P. Y., & Campisi, J. (2010). Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends in Molecular Medicine*, *16*(5), 238–246.

Friend, S. H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M., & Dryja, T. P. (1986). A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature*, *323*(6089), 643–646.

Froelich, C. J., Dixit, V. M., & Yang, X. (1998). Lymphocyte granule-mediated apoptosis: matters of viral mimicry and deadly proteases. *Immunology Today*, *19*(1), 30–36.

Fung, T. K., & Poon, R. Y. C. (2005). A roller coaster ride with the mitotic cyclins. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *16*(3), 335–342.

Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & 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. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, *85*(8), 348–362.

Gartel, A. L. (2005). The conflicting roles of the cdk inhibitor p21(CIP1/WAF1) in apoptosis. *Leukemia Research*, *29*(11), 1237–1238.

Gartel, A. L., & Tyner, A. L. (1999). Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Experimental Cell Research*, *246*(2), 280–289.

3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell*, 4(5), 361–370.

Guerra, C., Mijimolle, N., Dhawahir, A., Dubus, P., Barradas, M., Serrano, M., Campuzano, V., & Barbacid, M. (2003). Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. *Cancer Cell*, 4(2), 111–120.

Gudon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol*. 1962 Dec; 10:622-40. PMID: 13951335

Gurtner, G. C., Werner, S., Barrandon, Y., & Longaker, M. T. (2008). Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193), 314–321.

Hakem, R., Hakem, A., Duncan, G. S., Henderson, J. T., Woo, M., Soengas, M. S., Elia, A., De La Pompa, J. L., Kagi, D., Khoo, W., Potter, J., Yoshida, R., Kaufman, S. A., Lowe, S. W., Penninger, J. M., & Mak, T. W. (1998). Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo. *Cell*, 94(3), 339–352.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.

Harris, W. J., Huang, X., Lynch, J. T., Spencer, G. J., Hitchin, J. R., Li, Y., Ciceri, F., Blaser, J. G., Greystoke, B. F., Jordan, A. M., Miller, C. J., Ogilvie, D. J., & Somerville, T. C. P. (2012). The histone demethylase KDM1A sustains the oncogenic potential of MLL-AF9 leukemia stem cells. *Cancer Cell*, 21(4), 473–487.

HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. *Experimental Cell Research*, 37(3), 614–636.

Hayflick, L., & Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research*, 25(3), 585–621.

He, S., Nakada, D., & Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 25, 377–406.

Heiden, M. G. V., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1029–1033.

Helin, K. (1998). Regulation of cell proliferation by the E2F transcription factors. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(1), 28–35.

Helman, A., Klochendler, A., Azazmeh, N., Gabai, Y., Horwitz, E., Anzi, S., Swisa, A., Condiotti, R., Granit, R. Z., Nevo, Y., Fixler, Y., Shreibman, D., Zamir, A., Tornovsky-Babeay, S., Dai, C., Glaser, B., Powers, A. C., Shapiro, A. M. J., Magnuson, M. A., ... Ben-Porath, I. (2016). p16(Ink4a)-induced senescence of pancreatic beta cells enhances insulin secretion. *Nature Medicine*, 22(4), 412–420.

Herranz, N., & Gil, J. (2018). Mechanisms and functions of cellular senescence. *Journal of Clinical Investigation*, 128(4), 1238–1246.

Hochedlinger, K., Yamada, Y., Beard, C., & Jaenisch, R. (2005). Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and

causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell*, 121(3), 465–477.

Hofer, F., Fields, S., Schneider, C., & Martin, G. S. (1994). Activated Ras interacts with the Ral guanine nucleotide dissociation stimulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(23), 11089–11093.

Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., & Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*, 460(7259), 1132–1135.

Horowitz, J. M., Yandell, D. W., Park, S. H., Canning, S., Whyte, P., Buchkovich, K., Harlow, E., Weinberg, R. A., & Dryja, T. P. (1989). Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene. *Science (New York, N.Y.)*, 243(4893), 937–940.

Hu, W., Feng, Z., & Levine, A. J. (2012). The Regulation of Multiple p53 Stress Responses is Mediated through MDM2. *Genes & Cancer*, 3(3–4), 199–208.

Hurley, J. B., Simon, M. I., Teplow, D. B., Robishaw, J. D., & Gilman, A. G. (1984). Homologies between signal transducing G proteins and ras gene products. *Science (New York, N.Y.)*, 226(4676), 860–862.

Imaizumi, Y., & Okano, H. (2014). Modeling human neurological disorders with induced pluripotent stem cells. *Journal of Neurochemistry*, 129(3), 388–399.

Indovina, P., Marcelli, E., Casini, N., Rizzo, V., & Giordano, A. (2013). Emerging roles of RB family: new defense mechanisms against

tumor progression. *Journal of Cellular Physiology*, 228(3), 525–535.

Jacks, T., Fazeli, A., Schmitt, E. M., Bronson, R. T., Goodell, M. A., & Weinberg, R. A. (1992). Effects of an Rb mutation in the mouse. *Nature*, 359(6393), 295–300.

Jiang, J., Lv, W., Ye, X., Wang, L., Zhang, M., Yang, H., Okuka, M., Zhou, C., Zhang, X., Liu, L., & Li, J. (2013). Zscan4 promotes genomic stability during reprogramming and dramatically improves the quality of iPS cells as demonstrated by tetraploid complementation. *Cell Research*, 23(1), 92–106.

Johnson, D. G., & Schneider-Broussard, R. (1998). Role of E2F in cell cycle control and cancer. *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library*, 3.

Jun, J. II, & Lau, L. F. (2010). The matricellular protein CCN1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. *Nature Cell Biology*, 12(7), 676–685.

Jurk, D., Wilson, C., Passos, J. F., Oakley, F., Correia-Melo, C., Greaves, L., Saretzki, G., Fox, C., Lawless, C., Anderson, R., Hewitt, G., Pender, S. L. F., Fullard, N., Nelson, G., Mann, J., Van De Sluis, B., Mann, D. A., & Von Zglinicki, T. (2014). Chronic inflammation induces telomere dysfunction and accelerates ageing in mice. *Nature Communications*, 2.

Kamata, T., & Feramisco, J. R. (1984). Epidermal growth factor stimulates guanine nucleotide binding activity and phosphorylation of ras oncogene proteins. *Nature*, 310(5973), 147–150.

K., Tavtigian, S. V., Stockert, E., Day, R. S., Johnson, B. E., & Skolnick, M. H. (1994). A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science (New York, N.Y.)*, 264(5157), 436–440.

Kang, T. W., Yevsa, T., Woller, N., Hoenicke, L., Wuestefeld, T., Dauch, D., Hohmeyer, A., Gereke, M., Rudalska, R., Potapova, A., Iken, M., Vucur, M., Weiss, S., Heikenwalder, M., Khan, S., Gil, J., Bruder, D., Manns, M., Schirmacher, P., ... Zender, L. (2011). Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. *Nature*, 479(7374), 547–551.

Kastenhuber, E. R., & Lowe, S. W. (2017). Putting p53 in Context. *Cell*, 170(6), 1062–1078.

Katz, J. P., Perreault, N., Goldstein, B. G., Actman, L., McNally, S. R., Silberg, D. G., Furth, E. E., & Kaestner, K. H. (2005). Loss of Klf4 in mice causes altered proliferation and differentiation and precancerous changes in the adult stomach. *Gastroenterology*, 128(4), 935–945.

Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y. V., Menendez, S., Morera, L. B., Raya, A., Wahl, G. M., & Belmonte, J. C. I. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature*, 460(7259), 1140–1144.

Kerr, J. F.R., Wyllie, A. H., & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26(4), 239–257.

Kerr, John F.R. (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology*, 181–182, 471–474.

Kikuchi, A., Demo, S. D., Ye, Z. H., Chen, Y. W., & Williams, L. T. (1994). ralGDS family members interact with the effector loop of ras p21. *Molecular and Cellular Biology*, *14*(11), 7483–7491.

Kim, J. (2020). Cellular reprogramming to model and study epigenetic alterations in cancer. *Stem Cell Research*, *49*(October), 102062.

Kim, J., Bamlet, W. R., Oberg, A. L., Chaffee, K. G., Donahue, G., Cao, X. J., Chari, S., Garcia, B. A., Petersen, G. M., & Zaret, K. S. (2017). Detection of early pancreatic ductal adenocarcinoma with thrombospondin-2 and CA19-9 blood markers. *Science Translational Medicine*, *9*(398).

Kim, J., Hoffman, J. P., Alpaugh, R. K., Rhimm, A. D., Reichert, M., Stanger, B. Z., Furth, E. E., Sepulveda, A. R., Yuan, C. X., Won, K. J., Donahue, G., Sands, J., Gumbs, A. A., & Zaret, K. S. (2013). An iPSC line from human pancreatic ductal adenocarcinoma undergoes early to invasive stages of pancreatic cancer progression. *Cell Reports*, *3*(6), 2088–2099.

Kim, J., & Zaret, K. S. (2015). Reprogramming of human cancer cells to pluripotency for models of cancer progression. *The EMBO Journal*, *34*(6), 739–747.

Knappe, N., Novak, D., Weina, K., Bernhardt, M., Reith, M., Larribere, L., Hölzel, M., Tüting, T., Gebhardt, C., Umansky, V., & Utikal, J. (2016). Directed Dedifferentiation Using Partial Reprogramming Induces Invasive Phenotype in Melanoma Cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *34*(4), 832–846.

Kondo, Y., Shen, L., Suzuki, S., Kurokawa, T., Masuko, K., Tanaka, Y., Kato, H., Mizuno, Y., Yokoe, M., Sugauchi, F., Hirashima,

N., Orito, E., Osada, H., Ueda, R., Guo, Y., Chen, X., Issa, J. P. J., & Sekido, Y. (2007). Alterations of DNA methylation and histone modifications contribute to gene silencing in hepatocellular carcinomas. *Hepatology Research: The Official Journal of the Japan Society of Hepatology*, 37(11), 974–983.

Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M. R., Kovalev, G. I., Al-Regaiey, K., Su, L., & Sharpless, N. E. (2004). Ink4a/Arf expression is a biomarker of aging. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(9),

Kulesa, H., Frampton, J., & Graf, T. (1995). GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblasts. *Genes & Development*, 9(10), 1250–1262.

Kumar, S. M., Liu, S., Lu, H., Zhang, H., Zhang, P. J., Gimotty, P. A., Guerra, M., Guo, W., & Xu, X. (2012). Acquired cancer stem cell phenotypes through Oct4-mediated dedifferentiation. *Oncogene*, 31(47), 4898–4911.

Kurz, D. J., Decary, S., Hong, Y., & Erusalimsky, J. D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *Journal of Cell Science*, 113 (Pt 20)(20), 3613–3622.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680–685.

Lane, D. P. (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358(6381), 15–16.

Lane, J. D., Lucocq, J., Pryde, J., Barr, F. A., Woodman, P. G., Allan, V. J., & Lowe, M. (2002). Caspase-mediated cleavage of the

stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 156(3), 495–509.

Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187–195.

Lee, E. Y. H. P., To, H., Shew, J. Y., Bookstein, R., Scully, P., & Lee, W. H. (1988). Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. *Science (New York, N.Y.)*, 241(4862), 218–221.

Lee, J., Go, Y., Kang, I., Han, Y. M., & Kim, J. (2010). Oct-4 controls cell-cycle progression of embryonic stem cells. *The Biochemical Journal*, 426(2), 171–181.

Lee, M. H., Reynisdottir, I., & Massague, J. (1995). Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes & Development*, 9(6), 639–649.

Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88(3), 323–331.

Li, C., Zhou, J., Shi, G., Ma, Y., Yang, Y., Gu, J., Yu, H., Jin, S., Wei, Z., Chen, F., & Jin, Y. (2009). Pluripotency can be rapidly and efficiently induced in human amniotic fluid-derived cells. *Human Molecular Genetics*, 18(22), 4340–4349.

Li, H., Collado, M., Villasante, A., Matheu, A., Lynch, C. J., Cañamero, M., Rizzoti, K., Carneiro, C., Martínez, G., Vidal, A.,

Lovell-Badge, R., & Serrano, M. (2012). p27(Kip1) directly represses Sox2 during embryonic stem cell differentiation. *Cell Stem Cell*, *11*(6), 845–852.

Li, H., Collado, M., Villasante, A., Strati, K., Ortega, S., Cãamero, M., Blasco, M. A., & Serrano, M. (2009). The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature*, *460*(7259), 1136–1139.

Liu, H., Ye, Z., Kim, Y., Sharkis, S., & Jang, Y. Y. (2010). Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *51*(5), 1810–1819.

Liu, P., Chen, M., Liu, Y., Qi, L. S., & Ding, S. (2018). CRISPR-Based Chromatin Remodeling of the Endogenous Oct4 or Sox2 Locus Enables Reprogramming to Pluripotency. *Cell Stem Cell*, *22*(2), 252–261.e4.

Lüthi, A. U., & Martin, S. J. (2007). The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. *Cell Death and Differentiation*, *14*(4), 641–650.

Malumbres, M., & Barbacid, M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nature Reviews. Cancer*, *3*(6), 459–465.

Manning, B. D., & Cantley, L. C. (2007). AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell*, *129*(7), 1261–1274. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.06.009>

Marión, R. M., Strati, K., Li, H., Murga, M., Blanco, R., Ortega, S., Fernandez-Capetillo, O., Serrano, M., & Blasco, M. A. (2009). A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure

iPS cell genomic integrity. *Nature*, 460(7259), 1149–1153.

Martí, M., Mulero, L., Pardo, C., Morera, C., Carrió, M., Laricchia-Robbio, L., Esteban, C. R., & Belmonte, J. C. I. (2013). Characterization of pluripotent stem cells. *Nature Protocols*, 8(2), 223–253.

Martin, S. J., Amarante-Mendes, G. P., Shi, L., Chuang, T. H., Casiano, C. A., O'Brien, G. A., Fitzgerald, P., Tan, E. M., Bokoch, G. M., Greenberg, A. H., & Green, D. R. (1996). The cytotoxic cell protease granzyme B initiates apoptosis in a cell-free system by proteolytic processing and activation of the ICE/CED-3 family protease, CPP32, via a novel two-step mechanism. *The EMBO Journal*, 15(10), 2407–2416.

McCormick, F. (1993). Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature*, 363(6424), 15–16.

McGrath, J. P., Capon, D. J., Goeddel, D. V., & Levinson, A. D. (1984). Comparative biochemical properties of normal and activated human ras p21 protein. *Nature*, 310(5979), 644–649.

Medema, R. H., Herrera, R. E., Lam, F., & Weinberg, R. A. (1995). Growth suppression by p16ink4 requires functional retinoblastoma protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(14), 6289–6293.

Michaloglou, C., Vredeveld, L. C. W., Soengas, M. S., Denoyelle, C., Kuilman, T., Van Der Horst, C. M. A. M., Majoor, D. M., Shay, J. W., Mooi, W. J., & Peeper, D. S. (2005). BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature*, 436(7051), 720–724.

Minamino, T., Orimo, M., Shimizu, I., Kunieda, T., Yokoyama, M., Ito, T., Nojima, A., Nabetani, A., Oike, Y., Matsubara, H., Ishikawa, F., & Komuro, I. (2009). A crucial role for adipose tissue p53 in the regulation of insulin resistance. *Nature Medicine*, *15*(9), 1082–1087.

Miyashita, T., Harigai, M., Hanada, M., & Reed, J. C. (1994). Identification of a p53-dependent negative response element in the bcl-2 gene. *Cancer Research*, *54*(12), 3131–3135.

MM, B. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248–254.

Moodie, S. A., Willumsen, B. M., Weber, M. J., & Wolfman, A. (1993). Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science (New York, N.Y.)*, *260*(5114), 1658–1661.

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., Gómez-López, G., De Martino, A., Blasco, M. A., Abad, M., & Serrano, M. (2016). Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, *354*(6315).

Mosteiro, L., Pantoja, C., de Martino, A., & Serrano, M. (2018). Senescence promotes in vivo reprogramming through p16 INK4a and IL-6. *Aging Cell*, *17*(2).

Requirement for ras proto-oncogene function during serum-stimulated growth of NIH 3T3 cells. *Nature*, 313(5999), 241–243.

Muñoz-Espín, D., Cañamero, M., Maraver, A., Gómez-López, G., Contreras, J., Murillo-Cuesta, S., Rodríguez-Baeza, A., Varela-Nieto, I., Ruberte, J., Collado, M., & Serrano, M. (2013). Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. *Cell*, 155(5),

Murillo, M. M., Zelenay, S., Nye, E., Castellano, E., Lassailly, F., Stamp, G., & Downward, J. (2014). RAS interaction with PI3K p110 α is required for tumor-induced angiogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(8), 3601–3611.

Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., Mann, M., Krammer, P. H., Peter, M. E., & Dixit, V. M. (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*, 85(6), 817–827.

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., & Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology*, 26(1), 101–106.

Nakayama, K., Ishida, N., Shirane, M., Inomata, A., Inoue, T., Shishido, N., Horii, I., Loh, D. Y., & Nakayama, K. I. (1996). Mice lacking p27(Kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. *Cell*, 85(5), 707–720.

Narla, G., Heath, K. E., Reeves, H. L., Li, D., Giono, L. E., Kimmelman, A. C., Glucksman, M. J., Narla, J., Eng, F. J., Chan, A. M., Ferrari, A. C., Martignetti, J. A., & Friedman, S. L. (2001). KLF6, a candidate tumor suppressor gene mutated in prostate cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5551), 2563–2566.

Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death and Differentiation*, 6(11), 1028–1042.

Nijhawan, D., Honarpour, N., & Wang, X. (2000). Apoptosis in neural development and disease. *Annual Review of Neuroscience*, 23, 73–87.

Nishi, M., Sakai, Y., Akutsu, H., Nagashima, Y., Quinn, G., Masui, S., Kimura, H., Perrem, K., Umezawa, A., Yamamoto, N., Lee, S. W., & Ryo, A. (2014). Induction of cells with cancer stem cell properties from nontumorigenic human mammary epithelial cells by defined reprogramming factors. *Oncogene*, 33(5), 643–652.

Nishimura, K., Sano, M., Ohtaka, M., Furuta, B., Umemura, Y., Nakajima, Y., Ikehara, Y., Kobayashi, T., Segawa, H., Takayasu, S., Sato, H., Motomura, K., Uchida, E., Kanayasu-Toyoda, T., Asashima, M., Nakauchi, H., Yamaguchi, T., & Nakanishia, M. (2011). Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(6), 4760–4771.

Ocampo, A., Reddy, P., Martinez-Redondo, P., Platero-Luengo, A., Hatanaka, F., Hishida, T., Li, M., Lam, D., Kurita, M., Beyret, E., Araoka, T., Vazquez-Ferrer, E., Donoso, D., Roman, J. L., Xu, J., Rodriguez Esteban, C., Nuñez, G., Nuñez Delicado, E., Campistol, J.

M., ... Izipisua Belmonte, J. C. (2016). In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell*, 167(7), 1719–1733.e12.

Ohnishi, K., Semi, K., Yamamoto, T., Shimizu, M., Tanaka, A., Mitsunaga, K., Okita, K., Osafune, K., Arioka, Y., Maeda, T., Soejima, H., Moriwaki, H., Yamanaka, S., Woltjen, K., & Yamada, Y. (2014). Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell*, 156(4), 663–677.

Opferman, J. T., & Korsmeyer, S. J. (2003). Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. *Nature Immunology*, 4(5), 410–415.

Orkin, S. H., & Hochedlinger, K. (2011). Chromatin connections to pluripotency and cellular reprogramming. *Cell*, 145(6), 835–850.

Orlova-Fink, N., Chowdhury, F. Z., Sun, X., Harrington, S., Rosenberg, E. S., Yu, X. G., & Lichterfeld, M. (2017). Preferential susceptibility of Th9 and Th2 CD4+ T cells to X4-tropic HIV-1 infection. *AIDS (London, England)*, 31(16), 2211–2215.

Parker, L. L., & Piwnica-Worms, H. (1992). Inactivation of the p34cdc2-cyclin B complex by the human WEE1 tyrosine kinase. *Science (New York, N.Y.)*, 257(5078), 1955–1957.

Pinkoski, M. J., Waterhouse, N. J., Heibein, J. A., Wolf, B. B., Kuwana, T., Goldstein, J. C., Newmeyer, D. D., Bleackley, R. C., & Green, D. R. (2001). Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(15), 12060–12067.

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., Bar-Nur, O., Cheloufi, S., Stadtfeld, M., Figueroa, M. E., Robinton, D., Natesan, S., Melnick, A., Zhu, J., Ramaswamy, S., & Hochedlinger, K. (2012). A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell*.

Polyak, K., Kato, J. Y., Solomon, M. J., Sherr, C. J., Massague, J., Roberts, J. M., & Koff, A. (1994). p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. *Genes & Development*, 8(1), 9–22.

Riggi, N., Suvà, M. L., De Vito, C., Provero, P., Stehle, J. C., Baumer, K., Cironi, L., Janiszewska, M., Petricevic, T., Suvà, D., Tercier, S., Joseph, J. M., Guillou, L., & Stamenkovic, I. (2010). EWS-FLI-1 modulates miRNA145 and SOX2 expression to initiate mesenchymal stem cell reprogramming toward Ewing sarcoma cancer stem cells. *Genes & Development*, 24(9), 916–932.

Robertson, A. M. G., Bird, C. C., Waddell, A. W., & Currie, A. R. (1978). Morphological aspects of glucocorticoid-induced cell death in human lymphoblastoid cells. *The Journal of Pathology*, 126(3), 181–187.

Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., Waterfield, M. D., & Downward, J. (1994). Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature*, 370(6490), 527–532.

Rosa, A., & Brivanlou, A. H. (2010). Synthetic mRNAs: powerful tools for reprogramming and differentiation of human cells. *Cell Stem*

Cell, 7(5), 549–550. 2

Rowland, B. D., Bernards, R., & Peeper, D. S. (2005). The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nature Cell Biology*, 7(11), 1074–1082.

Rowland, B. D., & Peeper, D. S. (2006). KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 6(1), 11–23.

S, S., DM, K., WW, Y., GW, B., & AM, S. (2015). Role of nanotopography in the development of tissue engineered 3D organs and tissues using mesenchymal stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 7(2), 266.

Sage, J. (2012). The retinoblastoma tumor suppressor and stem cell biology. *Genes & Development*, 26(13), 1409–1420.

Sarkar, A., & Hochedlinger, K. (2013). The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate. *Cell Stem Cell*, 12(1), 15–30.

Sasaki, M., Kumazaki, T., Takano, H., Nishiyama, M., & Mitsui, Y. (2001). Senescent cells are resistant to death despite low Bcl-2 level. *Mechanisms of Ageing and Development*, 122(15), 1695–1706.

Scheffzek, K., Ahmadian, M. R., Kabsch, W., Wiesmüller, L., Lautwein, A., Schmitz, F., & Wittinghofer, A. (1997). The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5324), 333–338.

Serrano, M., Lin, A. W., McCurrach, M. E., Beach, D., & Lowe, S.

W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 88(5), 593–602.

Sherr, C. J. (2012). Ink4-Arf locus in cancer and aging. *Wiley Interdisciplinary Reviews. Developmental Biology*, 1(5), 731–741.

Sherr, C. J., & Roberts, J. M. (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & Development*, 13(12), 1501–1512.

Shibata, H., Komura, S., Yamada, Y., Sankoda, N., Tanaka, A., Ukai, T., Kabata, M., Sakurai, S., Kuze, B., Woltjen, K., Haga, H., Ito, Y., Kawaguchi, Y., Yamamoto, T., & Yamada, Y. (2018). In vivo reprogramming drives Kras-induced cancer development. *Nature Communications*, 9(1).

Simanshu, D. K., Nissley, D. V., & McCormick, F. (2017). RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. *Cell*, 170(1), 17–33.

Smith, A. G. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 17, 435–462.

Soengas, M. S., Capodici, P., Polsky, D., Mora, J., Esteller, M., Opitz-Araya, X., McCombie, R., Herman, J. G., Gerald, W. L., Lazebnik, Y. A., Cerdón-Cardó, C., & Lowe, S. W. (2001). Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature*, 409(6817), 207–211.

Soufi, A., Donahue, G., & Zaret, K. S. (2012). Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell*, 151(5), 994–1004.

Spaargaren, M., & 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(26), 12609–12613.

Sridharan, R., Tchieu, J., Mason, M. J., Yachechko, R., Kuoy, E., Horvath, S., Zhou, Q., & Plath, K. (2009). Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency. *Cell*, *136*(2), 364–377.

Stabler, C. T., Lecht, S., Mondrinos, M. J., Goulart, E., Lazarovici, P., & Lelkes, P. I. (2015). Revascularization of decellularized lung scaffolds: principles and progress. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, *309*(11), L1273–L1285.

Stennicke, H. R., Jürgensmeier, J. M., Shin, H., Deveraux, Q., Wolf, B. B., Yang, X., Zhou, Q., Ellerby, H. M., Ellerby, L. M., Bredesen, D., Green, D. R., Reed, J. C., Froelich, C. J., & Salvesen, G. S. (1998). Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(42), 27084–27090.

Stennicke, H. R., & Salvesen, G. S. (1998). Properties of the caspases. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1387*(1–2), 17–31.

Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M. C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J., & Keyes, W. M. (2013). Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. *Cell*, *155*(5), 1119.

reprogramming in cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 339(6127), 1567–1570.

Sweet, R. W., Yokoyama, S., Kamata, T., Feramisco, J. R., Rosenberg, M., & Gross, M. (1984). The product of ras is a GTPase and the T24 oncogenic mutant is deficient in this activity. *Nature*, 311(5983), 273–275.

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676.

Telias, M., & Ben-Yosef, D. (2014). Modeling neurodevelopmental disorders using human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 10(4), 494–511.

Toyoshima, H., & Hunter, T. (1994). p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell*, 78(1), 67–74.

Trahey, M., Wong, G., Halenbeck, R., Rubinfeld, B., Martin, G. A., Ladner, M., Long, C. M., Crosier, W. J., Watt, K., Kohts, K., & McCormick, F. (1988). Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4886), 1697–1700.

Tsai, C. C., Su, P. F., Huang, Y. F., Yew, T. L., & Hung, S. C. (2012). Oct4 and Nanog directly regulate Dnmt1 to maintain self-renewal and undifferentiated state in mesenchymal stem cells. *Molecular Cell*, 47(2), 169–182.

Walsh, R. M., Khalil, A., Rheinwald, J. G., & Hochedlinger, K. (2009). Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature*, *460*(7259), 1145–1148.

Van De Craen, M., Van Den Brande, I., Declercq, W., Irmeler, M., Beyaert, R., Tschopp, J., Fiers, W., & Vandenabeele, P. (1997). Cleavage of caspase family members by granzyme B: a comparative study in vitro. *European Journal of Immunology*, *27*(5), 1296–1299.

Van Den Heuvel, S., & Dyson, N. J. (2008). Conserved functions of the pRB and E2F families. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *9*(9), 713–724.

Van Den Heuvel, S., & Harlow, E. (1993). Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science (New York, N.Y.)*, *262*(5142), 2050–2054. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.8266103>

Van Deursen, J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, *509*(7501), 439–446.

Van Loo, G., Saelens, X., Van Gurp, M., MacFarlane, M., Martin, S. J., & Vandenabeele, P. (2002). The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. *Cell Death and Differentiation*, *9*(10), 1031–1042.

Varfolomeev, E. E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J. S., Mett, I. L., Rebrikov, D., Brodianski, V. M., Kemper, O. C., Kollet, O., Lapidot, T., Soffer, D., Sobe, T., Avraham, K. B., Goncharov, T., Holtmann, H., Lonai, P., & Wallach, D. (1998). Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity*, *9*(2), 267–276.

Varum, S., Rodrigues, A. S., Moura, M. B., Momcilovic, O., Easley IV, C. A., Ramalho-Santos, J., van Houten, B., & Schatten, G. (2011). Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PLoS One*, 6(6).

Vilas, J. M., Ferreirós, A., Carneiro, C., Morey, L., Silva-álvarez, S. Da, Fernandes, T., Abad, M., Croce, L. Di, García-Caballero, T., Serrano, M., Rivas, C., Vidal, A., & Collado, M. (2015). Transcriptional regulation of Sox2 by the retinoblastoma family of pocket proteins. *Oncotarget*, 6(5), 2992–3002.

Vogel, U. S., Dixon, R. A. F., Schaber, M. D., Diehl, R. E., Marshall, M. S., Scolnick, E. M., Sigal, I. S., & Gibbs, J. B. (1988). Cloning of bovine GAP and its interaction with oncogenic ras p21. *Nature*, 335(6185), 90–93.

Vousden, K. H., & Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, 137(3), 413–431.

Waddington C. H. (1957). The strategy of the genes: a discussion of some aspects of theoretical biology.

Wang, E. (1995). Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer Research*, 55(11), 2284–2292.

Wang, Yajie, Lu, T., Sun, G., Zheng, Y., Yang, S., Zhang, H., Hao, S., Liu, Y., Ma, S., Zhang, H., Ru, Y., Gao, S., Yen, K., Cheng, H., & Cheng, T. (2019). Targeting of apoptosis gene loci by reprogramming factors leads to selective eradication of leukemia cells. *Nature Communications*, 10(1).

J., Sun, L., Yang, X., Shi, L., Li, R., Li, Y., Zhang, Y., Li, Q., Yi, X., & Shang, Y. (2009). LSD1 is a subunit of the NuRD complex and targets the metastasis programs in breast cancer. *Cell*, *138*(4), 660–672.

Wang, Yingcai, Blandino, G., & Givol, D. (1999). Induced p21^{waf} expression in H1299 cell line promotes cell senescence and protects against cytotoxic effect of radiation and doxorubicin. *Oncogene*, *18*(16), 2643–2649.

Warne, P. H., Vician, P. R., & Downward, J. (1993). Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature*, *364*(6435), 352–355.

Weissman, I. L., Anderson, D. J., & Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *17*, 387–403.

Wen-Hwa, L., Bookstein, R., Hong, F., Young, L. J., Shew, J. Y., & Lee, E. Y. H. P. (1987). Human retinoblastoma susceptibility gene: cloning, identification, and sequence. *Science (New York, N.Y.)*, *235*(4794), 1394–1399.

Wiley, C. D., Velarde, M. C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E. A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H. W., Davis, S. S., Ramanathan, A., Gerencser, A. A., Verdin, E., & Campisi, J. (2016). Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metabolism*, *23*(2), 303–314.

Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, *385*(6619), 810–813.

Wolfman, A., & Macara, I. G. (1990). A cytosolic protein catalyzes the release of GDP from p21ras. *Science (New York, N.Y.)*, 248(4951), 67–69.

Wood, K. W., Sarnecki, C., Roberts, T. M., & Blenis, J. (1992). ras mediates nerve growth factor receptor modulation of three signal-transducing protein kinases: MAP kinase, Raf-1, and RSK. *Cell*, 68(6), 1041–1050.

Wyllie, A. H., Kerr, J. F. R., & Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*, 68(C), 251–306.

Xie, H., Ye, M., Feng, R., & Graf, T. (2004). Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell*, 117(5), 663–676.

Xiong, Y., Hannon, G. J., Zhang, H., Casso, D., Kobayashi, R., & Beach, D. (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*, 366(6456), 701–704.

Xu, L., Davidson, B. J., Murty, V. V. V. S., Li, R. -G, Sacks, P. G., Garin-Chesa, P., Schantz, S. P., & Chaganti, R. S. K. (1994). TP53 gene mutations and CCND1 gene amplification in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *International Journal of Cancer*, 59(3), 383–387.

Yamanaka, S. (2009). A fresh look at iPS cells. *Cell*, 137(1), 13–17.

Yamanaka, S., & Blau, H. M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*, 465(7299), 704–712.

Yosef, R., Pilpel, N., Tokarsky-Amiel, R., Biran, A., Ovadya, Y., Cohen, S., Vadai, E., Dassa, L., Shahar, E., Condiotti, R., Ben-Porath, I., & Krizhanovsky, V. (2016). Directed elimination of senescent cells by inhibition of BCL-W and BCL-XL. *Nature Communications*, 7.

Young, A. P., Schisio, S., Minamishima, Y. A., Zhang, Q., Li, L., Grisanzio, C., Signoretti, S., & Kaelin, W. G. (2008). VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nature Cell Biology*, 10(3), 361–369.

Young, A. R. J., Narita, M., Ferreira, M., Kirschner, K., Sadaie, M., Darot, J. F. J., Tavaré, S., Arakawa, S., Shimizu, S., Watt, F. M., & Narita, M. (2009). Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes & Development*, 23(7), 798–803.

Zhang, J. Y. (2002). Apoptosis-based anticancer drugs. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 1(2), 101–102.

Zhang, P., Liégeois, N. J., Wong, C., Finegold, M., Hou, H., Thompson, J. C., Silverman, A., Harper, J. W., DePinho, R. A., & Elledge, S. J. (1997). Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature*, 387(6629), 151–158.

Zhang, S. Y., Caamano, J., Cooper, F., Guo, X., & Klein-Szanto, A. J. P. (1994). Immunohistochemistry of cyclin D1 in human breast cancer. *American Journal of Clinical Pathology*, 102(5), 695–698.

Zhang, X., Cruz, F. D., Terry, M., Remotti, F., & Matushansky, I. (2013). Terminal differentiation and loss of tumorigenicity of human cancers via pluripotency-based reprogramming. *Oncogene*, 32(18), 2249–2260.

Zhang, X. F., Settleman, J., Kyriakis, J., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S. J., Marshall, M. S., Bruder, J. T., Rapp, U. R., & Avruch, J. (1993). Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature*, *364*(6435), 308–313.

Zhao, W., Hisamuddin, I. M., Nandan, M. O., Babbin, B. A., Lamb, N. E., & Yang, V. W. (2004). Identification of Krüppel-like factor 4 as a potential tumor suppressor gene in colorectal cancer. *Oncogene*, *23*(2), 395–402. <https://doi.org/10.1038/SJ.ONC.1207067>

Zhen, H. Y., He, Q. H., Li, Y., Zhou, J., Yao, C., Liu, Y. N., & Ma, L. J. (2012). Lidamycin induces neural differentiation of mouse embryonic carcinoma cells through down-regulation of transcription factor Oct4. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *421*(1), 44–50.

Zhu, Y., Tchkonina, T., Fuhrmann-Stroissnigg, H., Dai, H. M., Ling, Y. Y., Stout, M. B., Pirtskhalava, T., Giorgadze, N., Johnson, K. O., Giles, C. B., Wren, J. D., Niedernhofer, L. J., Robbins, P. D., & Kirkland, J. L. (2016). Identification of a novel senolytic agent, navitoclax, targeting the Bcl-2 family of anti-apoptotic factors. *Aging Cell*, *15*(3), 428–435.



En este trabajo evaluamos las dificultades que presentan las células transformadas para ser reprogramadas. Además, vemos como durante el proceso de reprogramación estas células se ven afectadas negativamente, por lo que decidimos estudiar el efecto de la expresión de los factores de reprogramación en células transformadas. Observamos que la expresión de los factores de reprogramación reduce la viabilidad de las células transformadas y activa los procesos de apoptosis y senescencia celular, acompañados por un aumento de daño en el ADN. También evaluamos el papel de p21 en la respuesta celular a la expresión de los factores, demostrando que esta proteína juega un papel central como mediador en la activación de los procesos de senescencia y apoptosis observados durante la expresión de los factores de reprogramación.