

# Epigenética de la transdiferenciación y reprogramación celular

Maribel Parra

*La clonación, la fusión celular, la reprogramación de células somáticas a células madre pluripotentes y la transdiferenciación de células maduras nos han ayudado a comprender que la identidad celular no es irreversible. Al reevaluar el epigenetic landscape, se concluye que la epigenética gobierna, en última instancia, esa identidad celular y que se puede modular. El conocimiento exhaustivo de los mecanismos y reguladores epigenéticos que intervienen en dichos procesos permitirá en el futuro refinar la generación de células a la carta con potencial terapéutico.*

El proceso de desarrollo de un organismo implica múltiples pasos de especificación, compromiso y diferenciación celular. Las células madre embrionarias consideradas pluripotentes pueden diferenciarse en todos los tipos celulares que formarán el ectodermo, endodermo y mesodermo del organismo desarrollado. Durante este complejo proceso biológico, las células van perdiendo potencial de elección y diferenciación al tiempo que adquieren la identidad epigenética característica del nuevo tipo celular generado. Tradicionalmente, se había asumido que estos procesos de desarrollo y diferenciación celular eran irreversibles.

## ► Plasticidad celular

En 1957, Waddington representó gráficamente este concepto de irreversibilidad en su famoso *the Waddington's epigenetic landscape*<sup>1</sup> (fig. 1). Waddington situaba una célula madre en la cima de una colina con mucha pendiente. El descenso de dicha célula por la colina y el camino que tomaba representaba la elección (o especificación) celular para adquirir un linaje u otro acabando al pie de la colina siendo

una célula madura o somática diferenciada. Dada la altitud de dicha colina, a la célula diferenciada le era imposible volver a subir. En otras palabras, había adquirido una identidad epigenética celular irreversible y no podía volver atrás. Sin embargo, otros autores anteriormente ya habían planteado el concepto de *plasticidad celular*. El resultado de un proceso

biológico no podía ser tan estático. De hecho, hoy sabemos que los mecanismos epigenéticos que se dan en una célula son altamente dinámicos y reversibles.

El dogma de la irreversibilidad celular quedó en entredicho cuando un joven John Gurdon, realizando experimentos de transferencia nuclear de células somá-

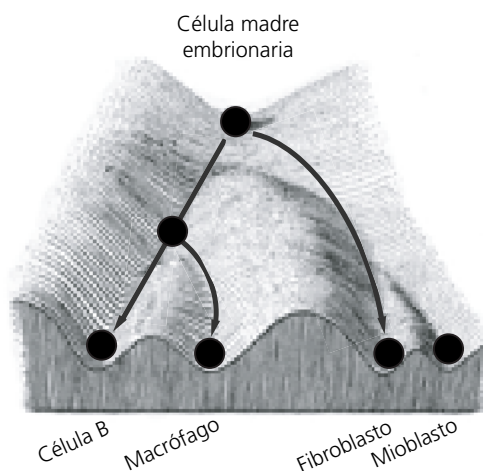


Figura 1. *The Waddington's epigenetic landscape*

ticas en ovocitos enucleados, clonó el primer animal, un tipo de rana denominada *Xenopus laevis*.<sup>2</sup> Con sus investigaciones, Gurdon demostró que el núcleo de una célula somática diferenciada de alguna manera conservaba un carácter pluripotente que era capaz de generar todo un organismo. No fue hasta 30 años después, en 1997, que Ian Willmut clonó el primer mamífero, la famosa oveja *Dolly* y solo un año después se clonó el primer ratón.

El científico Rudolf Jaenisch también ha aportado avances seminales en el campo de la clonación. En 2002, Jaenisch junto con su estudiante Konrad Hochedlinger publicaron un artículo en el que mostraban la generación de blastocitos de ratón y de células madre embrionarias derivadas del núcleo de linfocitos T y B. A partir de dichos blastocitos fueron capaces de generar ratones que presentaban inmunoglobulinas o reorganización del receptor de células T en todos los tejidos.<sup>3</sup> Este hallazgo demostraba de manera inequívoca que las células madre generadas provenían exclusivamente de la célula somática utilizada y no de una posible población celular «contaminante» con características pluripotentes en las células donantes. Las investigaciones con heterocariones, resultado de la fusión entre células madre embrionarias y células somáticas, han representado un abordaje experimental que también ha contribuido a avanzar en el concepto de plasticidad celular. En experimentos con heterocariones se observó que, una vez fusionadas la célula madre y la célula somática, esta última expresaba genes característicos de pluripotencia.

En 2006, Shinya Yamanaka publicó un fascinante artículo que ha revolucionado el campo de la investigación con células madre. En dicho artículo, Yamanaka demostraba que la introducción de cuatro factores de transcripción, los ahora llamados *factores Yamanaka*, en fibroblastos embrionarios y adultos de ratón, inducía su reprogramación a células madre pluripotentes con características similares a las células madre embrionarias. Dichas células, que se denominaron iPS por *induced-pluripotent stem cells*, cuando se transfirieron a blastocitos fueron capaces de inducir el desarrollo embrionario y generar todo un organismo, en este caso el ratón.<sup>4</sup> Un año más tarde, Yamanaka reproducía su experimento reprograman-

do células somáticas humanas. Este descubrimiento ha supuesto un gran impacto en el campo de la epigenética y numerosos laboratorios se han adentrado en la investigación con células madre iPS. De hecho, haciendo una búsqueda en Pubmed se puede comprobar lo vertiginoso que es intentar seguir los avances y la literatura publicada en este campo.

En España, varios científicos han hecho aportaciones excelentes en la investigación con células iPS como Juan Carlos Izpisua, Ángel Raya, Manuel Serrano, Juan Antonio Bueren y Thomas Graf. La relevancia de este hallazgo se refleja en el hecho de que solo seis años más tarde de la publicación de su artículo, Yamanaka recibía el premio Nobel de Fisiología o Medicina por su descubrimiento, que ha supuesto una explosión de investigaciones dirigidas a entender y refinar el proceso

**«Se presenta la posibilidad de generar células a la carta con prometedoras aplicaciones en medicina regenerativa.»**

de reprogramación de células somáticas a células madre pluripotentes. Cabe destacar aquí que Yamanaka no recibió el Nobel en solitario. Sir John Gurdon fue también galardonado con el premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2012 por su trabajo seminal en la clonación de animales.

Aparte del avance conceptual indiscutible, dos aspectos importantes se derivan del trabajo de Yamanaka. Por una parte, se presenta la posibilidad de generar células a la carta. Se abre una puerta muy prometedora a posibles aplicaciones en medicina regenerativa, pudiendo obtener en una placa de Petri células madre «sanas o corregidas» a partir, por ejemplo, de fibroblastos de un paciente. En teoría, estas células iPS se podrían diferenciar al tipo celular deseado y en caso de poder trasplantarse al paciente se evitaría el rechazo inmunológico (fig. 2). Por otra parte, el hallazgo de Yamanaka supone una alternativa al uso de células madre embrionarias humanas resolviendo el problema ético que conlleva su obtención de embriones humanos congelados.

► **Pioneros de la transdiferenciación celular**

Llegados a este punto, introduciremos el concepto de *transdiferenciación celular*, considerado como un tipo de reprogramación, en el que una célula madura se convierte en otro tipo celular también diferenciado. Nos debemos remontar a 1979, cuando se describió que fibroblastos tratados con el agente desmetilante del DNA, 5-azacitidina (AzaC), se convertían o transdiferenciaban en mioblastos, precursores de células de músculo esquelético.<sup>5</sup> Sobre la base de este trabajo, Andrew Lassar y Harold Weintraub pensaron que estos mioblastos transdiferenciados debían expresar algún factor específico de células musculares lo que les llevó al descubrimiento y clonaje del factor de transcripción *Myod*. Lassar y Weintraub demostraron que la introducción de *Myod* en fibroblastos inducía su transdiferenciación a células musculares.<sup>6</sup>

Aunque a simple vista parezca menos espectacular que el descubrimiento de Yamanaka, las investigaciones de Lassar y Weintraub representaron una revolución y un enorme avance en el concepto de plasticidad celular. Era cierto, no todo en biología celular era tan estático e inamovible como se pudiera asumir. El perfil de genes expresados y el epigenoma específico de una célula concreta se podía cambiar radicalmente solo introduciendo un factor de transcripción y hacer que adquiriera una identidad celular totalmente diferente. Desde el experimento de Weintraub se han descrito numerosos procesos de transdiferenciación celular (fig. 3) (para revisiones recientes, véanse Graf<sup>7</sup> y Ladewig *et al.*<sup>8</sup>). Thomas Graf ha sido un científico pionero en el campo de la transdiferenciación celular. En 1995, Graf demostró que la introducción del factor de transcripción de células eritroides, GATA-1 en mieloblastos inducía la expresión de marcadores de precursores de megacariocitos y eritrocitos al mismo tiempo que disminuía la expresión de proteínas mieloides.<sup>9</sup> Años más tarde, Thomas Graf demostró que se podía transdiferenciar linfocitos B y T a macrófagos expresando el factor de transcripción C/EBP $\alpha$ , crucial en la diferenciación mieloides.<sup>10,11</sup>

Así pues, la combinación del conocimiento adquirido a partir de experimentos de

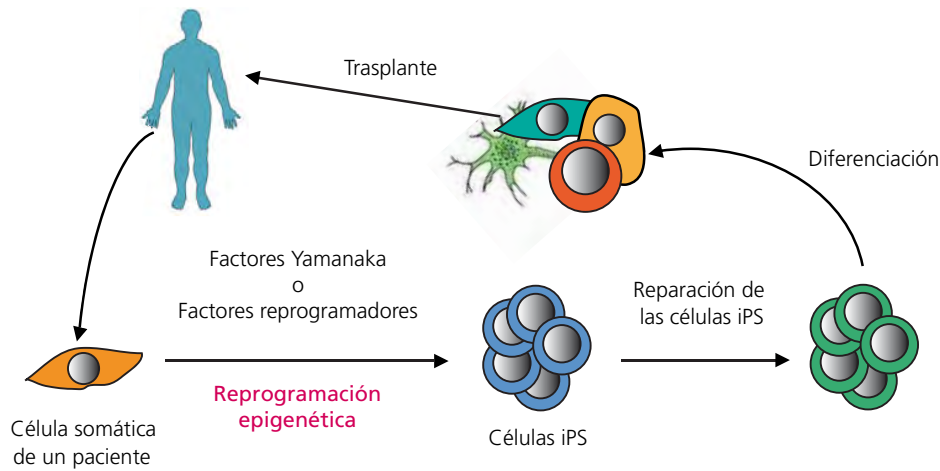


Figura 2. Esquema de la generación de células iPS y su posible aplicación terapéutica

clonación, de fusión celular, de reprogramación de células somáticas a células madre pluripotentes y de transdiferenciación de células maduras nos ha llevado a comprender que la identidad celular no es irreversible y nos lleva a reevaluar el *epigenetic landscape*.

El proceso de transdiferenciación celular más estudiado desde la perspectiva epigenética es el de la conversión de linfocitos a B a macrófagos. En 2004, Thomas Graf demostró que, si se introducía el factor de transcripción mieloide C/EBP $\alpha$  en células B, estas se transdiferenciaban a macrófagos funcionales.<sup>10</sup> Posteriormente, Thomas Graf y otros laboratorios se han adentrado en el estudio de los mecanismos epigenéticos que median dicho proceso. Graf ha demostrado que la proteína hidroxilasa de citosinas metiladas, Tet2, induce la derrepresión de genes mieloides durante la transdiferenciación de células B a macrófagos.<sup>13</sup>

Por otra parte, el grupo de Esteban Ballestar ha abordado el papel de la metilación del DNA y de microRNA en la transdiferenciación de linfocitos B a macrófagos. Sorprendentemente, no observaron desmetilación en genes característicos de macrófagos que se expresaban durante la transdiferenciación, pero sí cambios en modificaciones de histonas.<sup>14</sup> Más recientemente, Esteban Ballestar ha identificado microRNA que desempeñan un papel crucial en los cambios génicos que se producen durante este cambio de identidad celular.<sup>15</sup> Por otro lado, mi laboratorio ha identificado una histona desacetilasa que parece ser crucial en el

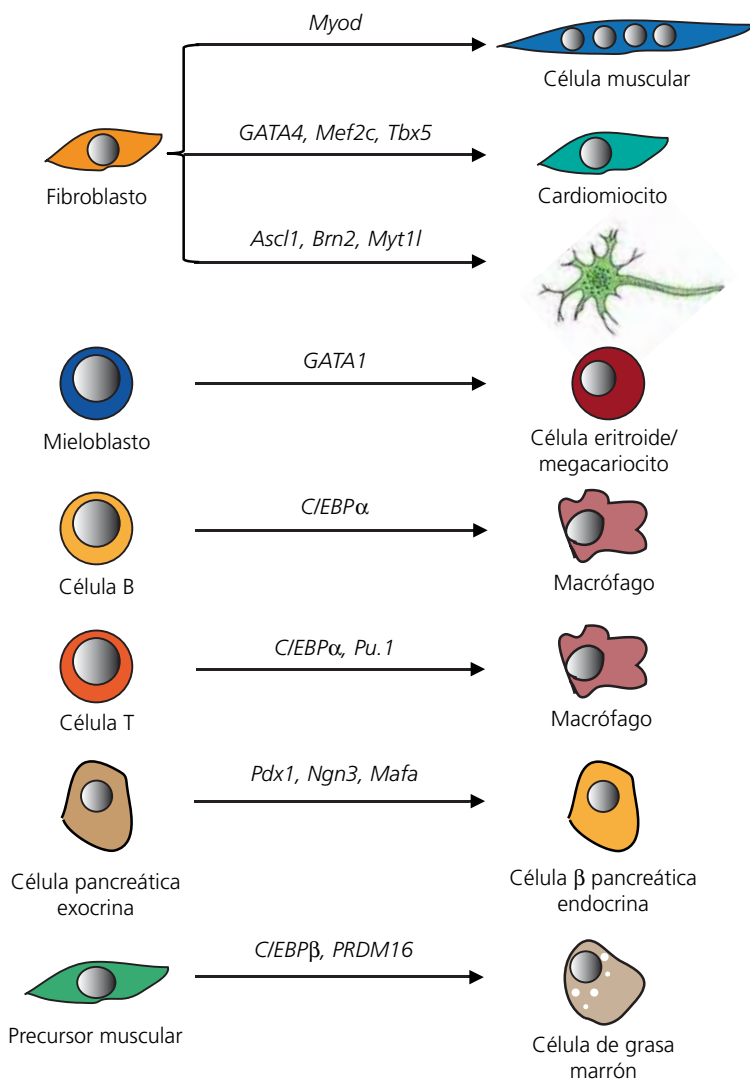


Figura 3. Procesos de transdiferenciación por la acción de factores de transcripción

Adaptada de Graf.<sup>7</sup>

## Paisajes epigenéticos

Hace unas semanas, asistí a una charla de Manuel Serrano en la que hablaba de su trabajo reciente de reprogramación a iPS *in vivo*, no en una placa de cultivo, sino en el mismo ratón.<sup>12</sup> Trabajo, por cierto, que ha sido seleccionado por la revista *Nature Medicine* como la mejor investigación con células madre de 2013. Durante la presentación, Manuel Serrano comentaba que el paisaje de Waddington era en realidad diferente. No era una alta montaña de difícil acceso, sino que se asemejaba más a una colina de pendiente suave por la que era más fácil transitar de un lugar a otro. La célula diferenciada podía volver a lo alto de la colina (reprogramación) e incluso pasear de un valle a otro (transdiferenciación) (fig. 4). Y es aquí cuando nos vamos a adentrar en la relevancia de los mecanismos epigenéticos en la reprogramación y transdiferenciación celular.

Si todas las células tienen, en principio, los mismos genes, algo tiene que ocurrir para que, por ejemplo, una célula muscular exprese genes característicos de músculo y no de otro tipo celular. Y ese mismo mecanismo que conduce a una identidad celular concreta puede ser revertido y modulado. La diferencia entre un tipo celular y otro se puede explicar, al menos en parte, en el estado de modificación de su cromatina, en su epigenoma. En una

célula muscular, los genes que codifican para proteínas del músculo estarán hipometilados y presentarán marcas activadoras en las histonas, como la acetilación. De esta manera, este gen de músculo se expresará. Sin embargo, en una célula de la sangre, por ejemplo un linfocito, este mismo gen estará hipermetilado y tendrá asociadas marcas represoras en las histonas. Así pues, no se expresará la proteína muscular en el linfocito. Dado el carácter reversible de los eventos epigenéticos, durante la reprogramación y la transdiferenciación se producen cambios en el epigenoma de la célula. Estos cambios darán lugar a la expresión de genes característicos de la nueva célula, ya sea de una célula iPS o de una célula transdiferenciada a otro linaje, así como al silenciamiento de genes de la célula de origen.

Volviendo al experimento que condujo a Lassar y Weintraub al descubrimiento de *Myod*, tenemos la primera evidencia del papel crucial de la epigenética en la transdiferenciación celular. Como sabemos, la metilación del DNA es un mecanismo epigenético clave en el silenciamiento de genes tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. El tratamiento de fibroblastos con 5-azacitina inducía su transdiferenciación a mioblastos. La explicación a este efecto era que un gen crucial en miogénesis, *Myod* estaba silenciado epigenéticamente en fibroblastos. Su DNA estaba metilado.

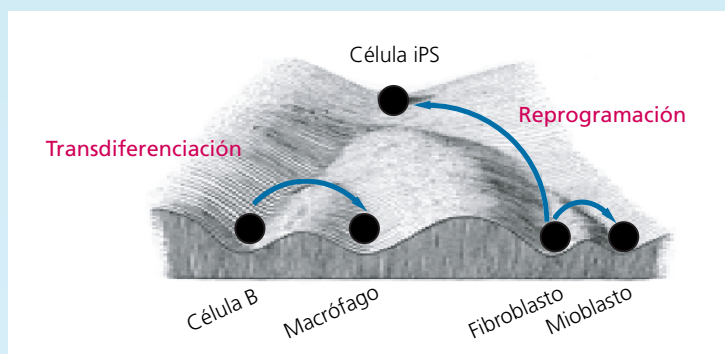


Figura 4. The Waddington's epigenetic landscape modificado

mantenimiento de la identidad de las células B. Los niveles de expresión de esta histona desacetilasa disminuyen durante la conversión de los linfocitos B a macrófagos siendo este un mecanismo clave para que la transdiferenciación se produzca

correctamente.<sup>16</sup> El estudio de este proceso de transdiferenciación nos demuestra que es necesaria la combinación de varios mecanismos epigenéticos para que se produzca correctamente la transdiferenciación y el cambio de identidad celular.

### ► La reprogramación celular

En cuanto a la reprogramación de células somáticas a células iPS, en muy pocos años se ha hecho un gran avance en entender cómo la epigenética es crucial en la modulación de los cambios celulares producidos. Las técnicas de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) y de ultrasecuenciación han hecho posible que tengamos una idea muy precisa del estado de la cromatina en células madre pluripotentes, así como de los cambios epigenéticos que se producen durante la reprogramación celular.

La cromatina de las células madre pluripotentes presenta una firma epigenética única que se asocia a su estado pluripotente. Por ejemplo, los genes asociados con desarrollo y diferenciación celular contienen una marca represora en la histona H3, la trimetilación de la lisina 27, que hace que dichos genes estén reprimidos. Sin embargo, los genes relacionados con renovación celular están enriquecidos con una marca activadora en la misma histona, la metilación de la lisina 4, resultando en su activación transcripcional.<sup>17</sup>

Para que se produzca correctamente la reprogramación de la célula somática a una célula iPS se tiene que producir un *reset* y reorganización del estado de su cromatina. Se han de perder marcas epigenéticas típicas de la célula somática al mismo tiempo que se adquieren las modificaciones que darán lugar a un estado que permita la pluripotencia celular. Un mecanismo epigenético clave durante la generación de células iPS y que supone la mayor barrera a la reprogramación es la metilación del DNA. Se considera que la metilación del DNA está implicada en la «memoria» de la célula somática. Durante la reprogramación la activación endógena de genes pluripotentes como *Oct4* viene dada por la desmetilación de sus regiones promotoras. Se ha observado que una desmetilación global insuficiente resulta en una reprogramación parcial, lo que podría explicar, en parte, la baja eficiencia en la generación de iPS.<sup>17</sup> Entre otros investigadores, María José Barrero y Juan Carlos Izpisua han aportado claves de cómo los mecanismos epigenéticos gobiernan el proceso de reprogramación a células iPS. En sus trabajos han abordado el papel de varios eventos epigenéticos como la metilación del DNA y de componentes y reguladores de la cromatina como histonas demetilinas o varian-

tes de histonas<sup>18-20</sup> (para una revisión reciente sobre epigenética en la reprogramación celular se puede consultar el artículo de Papp y Plath<sup>21</sup>).

Fruto del conocimiento que hemos adquirido sobre la reprogramación y la transdiferenciación celular podemos concluir que la epigenética gobierna, en última instancia, la identidad celular y ésta no es irreversible, sino que se puede modular. El conocimiento exhaustivo de los mecanismos y reguladores epigenéticos que intervienen en dichos procesos permitirá en el futuro (seguramente muy cercano) poder refinar e implementar la generación de células a la carta con potencial terapéutico. Esto es de especial importancia en el caso de las células iPS.

La generación de este tipo de célula pluripotente ha representado una revolución en el campo de las células madre, pero aún la comunidad científica y médica recoge esta técnica con cautela. Para su uso clínico, las células iPS deberían ser altamente seguras y no han de producir *daños colaterales* como consecuencia del método de generación. La obtención de células iPS *sanas* y no perjudiciales, por ejemplo sin la introducción de vectores retrovirales, es en la actualidad objeto de intensa investigación. Dada la velocidad de avance en este campo no tardaremos en tener células iPS que podamos plantear viable su uso terapéutico. La epigenética será, sin duda alguna, una potente arma para seleccionar las mejores células iPS. Aquellas que, por ejemplo, hayan reorganizado su cromatina correctamente y presenten la metilación del DNA y las modificaciones de histonas a nivel global, exactamente como una célula madre embrionaria.

Veremos qué nos depara el futuro. #

#### Maribel Parra

GRUPO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR  
PROGRAMA DE EPIGENÉTICA Y BIOLOGÍA  
DEL CÁNCER (PEBC)  
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DE BELLVITGE (IDIBELL)

#### ► Bibliografía

- Waddington CH: *The strategy of the genes; a discussion of some aspects of theoretical biology*. Londres: Allen & Unwin, 1957.
- Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M: Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 1958; 182 (4627): 64-5.

- Hochedlinger K, Jaenisch R: Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* 2002; 415 (6875): 1035-8.
- Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126 (4): 663-76.
- Taylor SM, Jones PA: Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 1979; 17 (4): 771-9.
- Davis RL, Weintraub H, Lassar AB: Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51 (6): 987-1000.
- Graf T: Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. *Cell Stem Cell* 2011; 9 (6): 504-16.
- Ladewig J, Koch P, Brüstle O: Leveling Waddington: the emergence of direct programming and the loss of cell fate hierarchies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; (4): 225-36.
- Kulesa H, Frampton J, Graf T: GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboplasts, and erythroblasts. *Genes Dev* 1995; 9 (10): 1250-62.
- Xie H, Ye M, Feng R, Graf T: Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 2004; 117 (5): 663-76.
- Laiosia CV, Stadtfeld M, Xie H, de Andres-Aguayo L, Graf T: Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity* 2006; 25 (5): 731-44.
- 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: Reprogramming *in vivo* produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* 2013; 502 (7471): 340-5.
- Kallin EM, Rodríguez-Ubrea J, Christensen J, Cimmino L, Aifantis I, Helin K, Ballestar E, Graf T: Tet2 facilitates the derepression of myeloid target genes during C/EBP-induced transdifferentiation of pre-B cells. *Mol Cell* 2012; 48 (2): 266-76.
- Rodríguez-Ubrea J, Ciudad L, Gómez-Cabrero D, Parra M, Bussmann LH, di Tullio A, Kallin EM, Tegnér J, Graf T, Ballestar E: Pre-B cell to macrophage transdifferentiation without significant promoter DNA methylation changes. *Nucleic Acids Res* 2012; 40 (5): 1954-68.
- Rodríguez-Ubrea J, Ciudad L, van Oevelen C, Parra M, Graf T, Ballestar E. C/EBP $\alpha$ -Mediated Activation of miR-34a and miR-223 Inhibits Lef1 Expression to Achieve Efficient Reprogramming into Macrophages. *Mol Cell Biol* 2014 Jan 13. [Epub ahead of print]
- Barneda-Zahonero B, Román-González L, Collazo O, Rafati H, Islam AB, Bussmann LH, di Tullio A, De Andres L, Graf T,

López-Bigas N, Mahmoudi T, Parra M: HDAC7 is a repressor of myeloid genes whose downregulation is required for transdifferentiation of pre-B cells into macrophages. *PLoS Genet* 2013; 9 (5): e1003503.

- Watanabe A, Yamada Y, Yamanaka S: Epigenetic regulation in pluripotent stem cells: a key to breaking the epigenetic barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013. 368 (1609): 20120292.
- Barrero MJ, Berdasco M, Paramonov I, Bilic J, Vitaloni M, Esteller M, Izpisua Belmonte JC: DNA hypermethylation in somatic cells correlates with higher reprogramming efficiency. *Stem Cells* 2012; (8): 1696-702.
- Adamo A, Sesé B, Boue S, Castaño J, Paramonov I, Barrero MJ, Izpisua Belmonte JC: LSD1 regulates the balance between self-renewal and differentiation in human embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 2011; (6): 652-9.
- Barrero MJ, Sese B, Kuebler B, Bilic J, Boue S, Martí M, Izpisua Belmonte JC: Macrohistone variants preserve cell identity by preventing the gain of H3K4me2 during reprogramming to pluripotency. *Cell Rep* 2013; 3 (4): 1005-11.
- Papp B, Plath K: Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell* 2013; 152 (6): 1324-43.

#### ► Bibliografía general recomendada

- 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: Reprogramming *in vivo* produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* 2013; 502 (7471): 340-5.
- Davis RL, Weintraub H, Lassar AB: Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51 (6): 987-1000.
- Graf T: Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. *Cell Stem Cell* 2011; 9 (6): 504-16.
- Gurdon, JB, Elsdale TR and Fischberg M: Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 1958; 182 (4627): 64-5.
- Papp B, Plath K: Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell* 2013; 152 (6): 1324-43.
- Takahashi K, Yamanaka S: Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126 (4): 663-76.
- Watanabe A, Yamada Y, Yamanaka S: Epigenetic regulation in pluripotent stem cells: a key to breaking the epigenetic barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2013; 368 (1609): 20120292.
- Xie H, Ye M, Feng R, Graf T: Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 2004; 117 (5): 663-76.