



Universidad
Católica
de Valencia
San Vicente Mártir



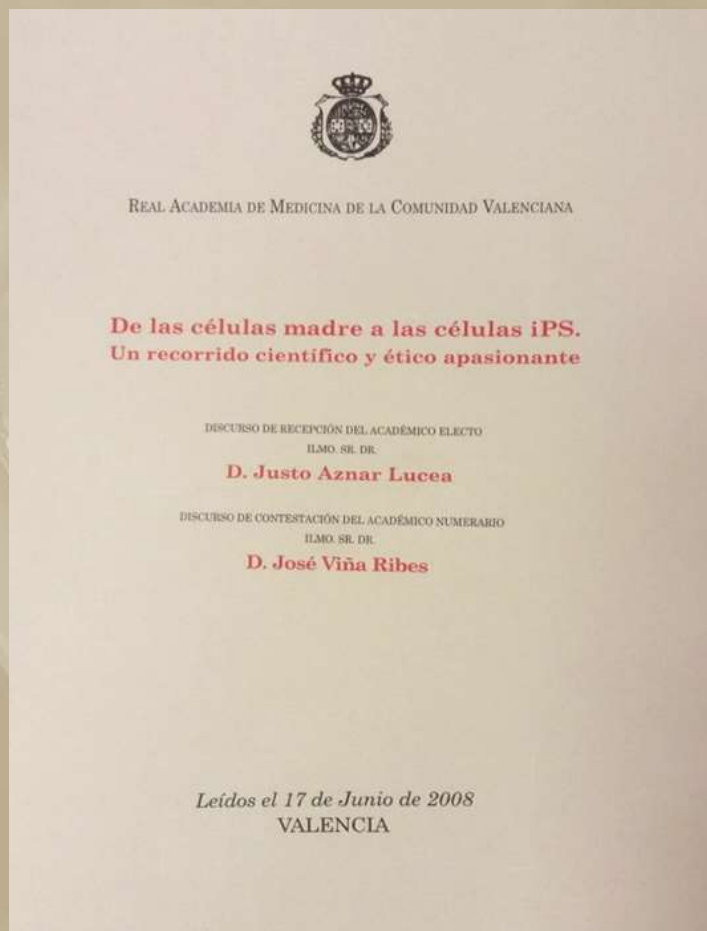
Diez años del descubrimiento de las células IPS: estado actual de su aplicación clínica.

Justo Aznar
Director del Instituto de
Ciencias de la Vida

Noviembre 2016



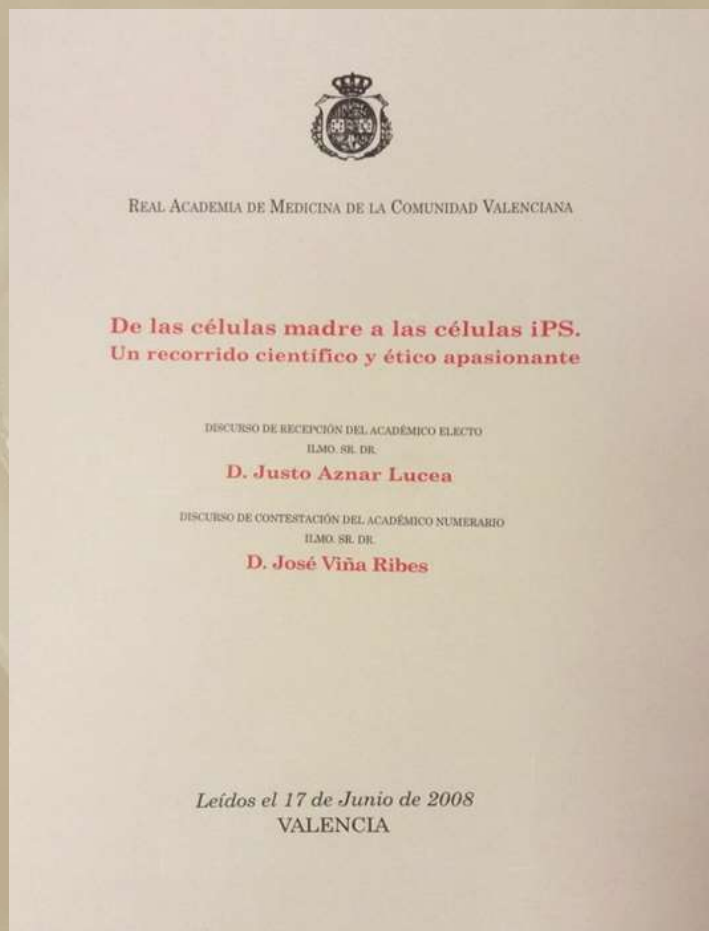
Discurso de entrada en la RAMCV



En junio de 2008, dos años después del descubrimiento de las células adultas reprogramadas (células troncales pluripotentes inducidas o células iPS), dediqué mi discurso de ingreso en esta Real Academia a dichas células, las iPS, haciendo un recorrido histórico de los pasos que se dieron hasta la puesta a punto de la técnica que las alumbró y también reflexionando sobre las posibilidades de su uso



Discurso de entrada en la RAMCV



En dicho discurso, tras comentar algunos de los aspectos históricos de su descubrimiento, me referí especialmente al procedimiento para obtenerlas y también a las experiencias preclínicas realizadas hasta ese momento



Importancia de la reprogramación celular

Sin duda, la puesta a punto de la reprogramación celular fue un hecho biomédico de gran relevancia, lo que llevó a la revista Science a definirla como el descubrimiento científico del año 2008 por la utilidad que puede tener en la investigación de graves enfermedades y por su probable utilización dentro del campo de la medicina regenerativa y reparadora

Science 322; 1767-1773, 2008



Concesión del premio Nobel

En el año 2012 fue concedido el premio Nobel de Medicina a John B Gurdon y Shinya Yamanaka porque según la Academia sueca «sus descubrimientos han revolucionado nuestra comprensión de como se desarrollan las células y los organismos y han creado nuevas oportunidades para investigar enfermedades y desarrollar métodos para diagnósticos y terapias, y más concretamente «por el descubrimiento de que las células maduras se pueden reprogramar para convertirse en pluripotentes»



Concesión del premio Nobel

John B Gurdon sentó las bases de la clonación en experimentos realizados en ranas en 1962. Sus experiencias fueron claves para la clonación de la oveja Dolly y posteriormente la de otros mamíferos

Shinya Yamanaka abrió el camino para la obtención de células troncales pluripotentes a partir de células adultas



Esquema de la conferencia

1

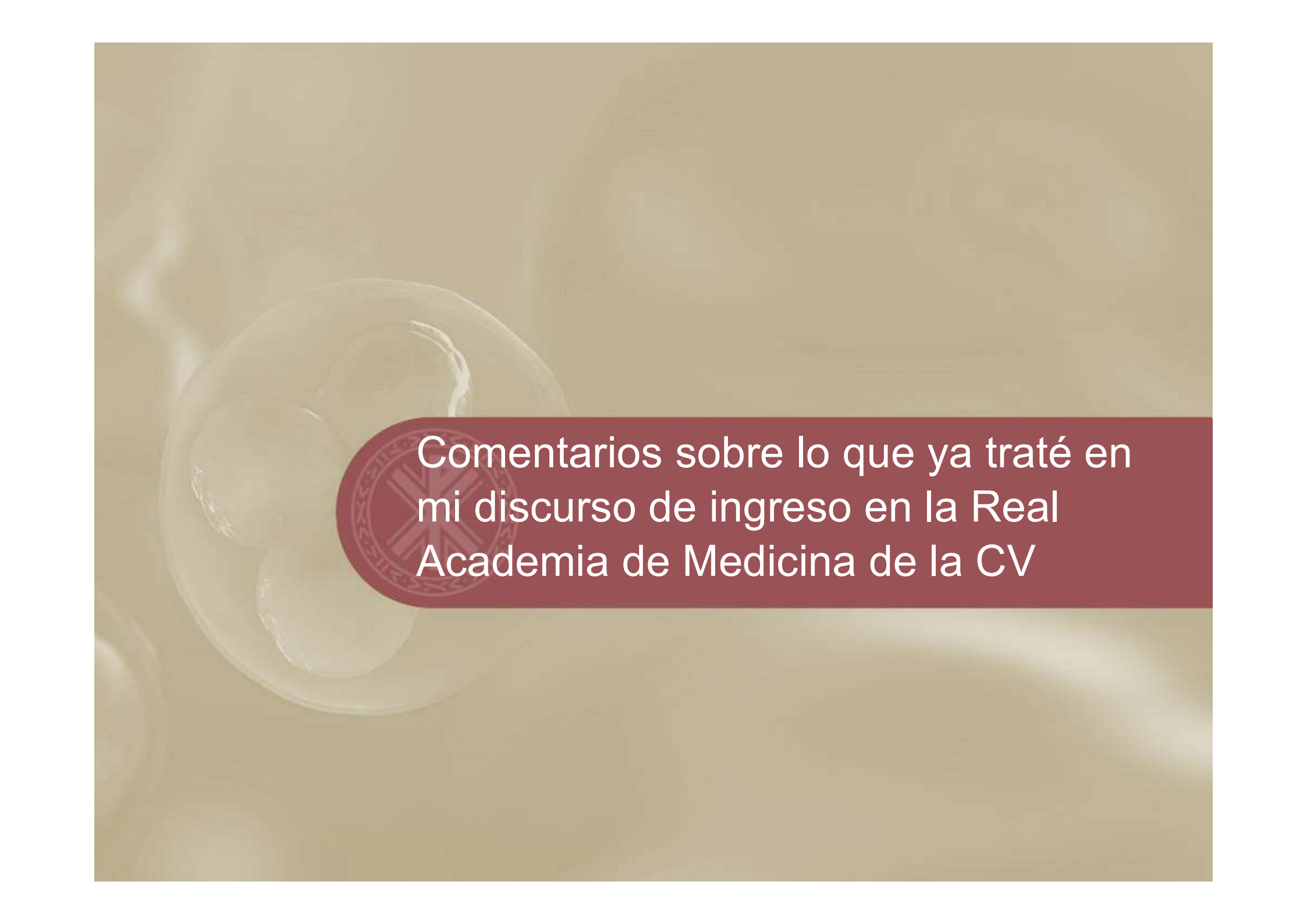
En primer lugar me referiré a lo que ya comenté sobre el tema en mi discurso de ingreso en la Real Academia.

2

En segundo realizaré una revisión del estado del arte en este momento.

3

Y en tercero trataré de reflexionar sobre las posibilidades futuras de uso de la reprogramación celular.

The background features a classical bust of a man's head in profile, facing right, rendered in a light, semi-transparent style. Overlaid on the bust is a faint, circular seal or emblem, likely the official seal of the Real Academia de Medicina de la CV, which contains a cross and other heraldic symbols. A dark red horizontal bar is positioned across the middle of the image, containing the main text in white.

Comentarios sobre lo que ya traté en
mi discurso de ingreso en la Real
Academia de Medicina de la CV



Células troncales. Pasado y futuro



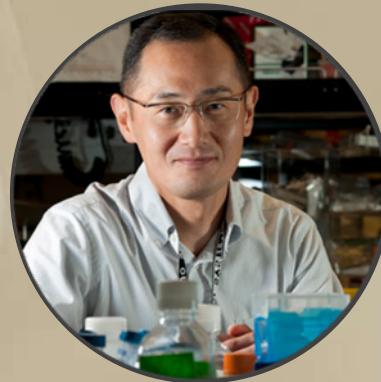
1998



James Thomson

Cultivan por primera vez células madre embrionarias humanas

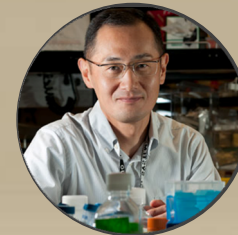
2006



Shinya Yamanaka

Obtienen células similares a las embrionarias por reprogramación de células adultas animales. Nacen las células iPS

2007



Obtienen células iPS humanas



Descubrimiento de las células pluripotentes por Takahashi y Yamanaka

Como recientemente comentaba Megan Scudellari, haciendo referencia al descubrimiento de las células iPS, Shinya Yamanaka miró con sorpresa a su investigador postdoctoral. «Tenemos colonias.» Shinya Yamanaka miró al investigador postdoctoral que había hablado. «Tenemos colonias.» repitió Kazutoshi Takahashi. Yamanaka saltó de su escritorio y siguió a Takahashi hasta la sala de tejidos en la Universidad de Kyoto. A través del microscopio vieron pequeños racimos de células. La culminación de cinco años de trabajo y un logro que Yamanaka ni siquiera estaba seguro de que fuera posible

Megan Scudellari
Investigación y Ciencia. Octubre 2016



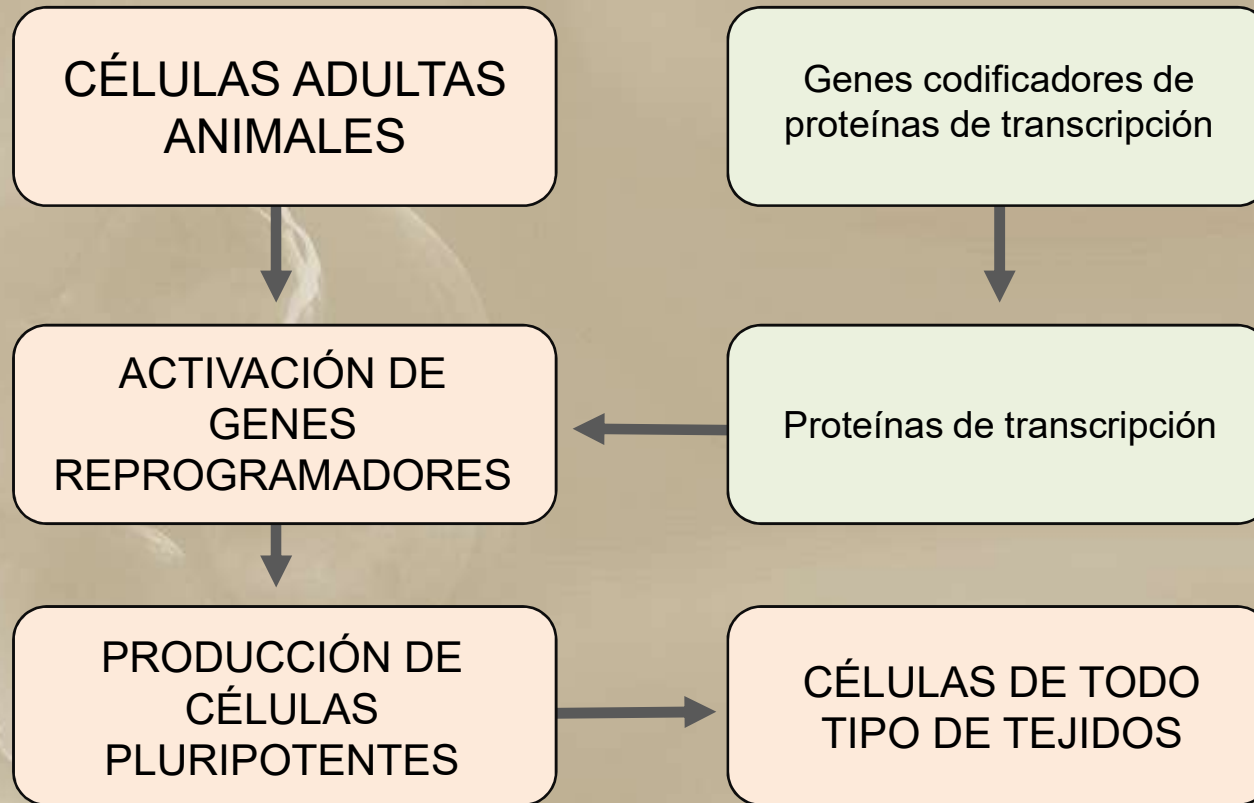
Descubrimiento de las células pluripotentes por Takahashi y Yamanaka

Dos semanas antes Takahashi había tomado células de la piel de ratones adultos para infectarlas con un virus diseñado para introducir 24 genes cuidadosamente elegidos. Ahora, las células se habían transformado, se parecían y se comportaban como células madre embrionarias. Eran células pluripotentes, con la capacidad de convertirse en células de la piel, del sistema nervioso, de los músculos o casi de cualquier otro tipo. Yamanaka contempló la alquimia celular delante de él. En ese momento pensé que debía tratarse de un error. Recuerda. Le pidió a Takahashi que hiciera el experimento una y otra vez. Cada vez funcionó.

Megan Scudellari
Investigación y Ciencia. Octubre 2016



¿En qué consiste técnicamente la reprogramación celular?



K. Takahashi y S. Yamanaka.
Cell 126; 652-655, 2006



Genes reprogramadores

Takahasi y Yamanaka partieron de 24 genes reprogramadores

Cell 126; 663-676, 2006



Genes reprogramadores

¿Cuántos genes se requieren para obtener las células iPS?



Reprogramación de células adultas humanas

Takahashi y col. (grupo Yamanaka):

Genes reprogramados: *Oct 3/4, Sox2, c-Myc y Klf4*

Medio para transferirlos: retrovirus

Fuente de células adultas: prepucio de recién nacido

Yu y col. (grupo Thomson):

Genes reprogramados: *Oct 3/4, Sox2, Lin 28 y Nanog*

Medio para transferirlos: lentivirus

Fuente de células adultas: fibroblastos fetales y neonatales



Obtención de células IPS de origen animal

Takahashi y Yamanaka siguiendo el anterior protocolo en 2006 obtuvieron las células iPS a partir de células somáticas animales

Cell 126; 663-676, 2006



Obtención de células IPS de origen animal

También, Wernig y colaboradores consiguieron la reprogramación in vitro de fibroblastos a células pluripotentes, utilizando los mismos genes reprogramadores que Takahashi y Yamanaka

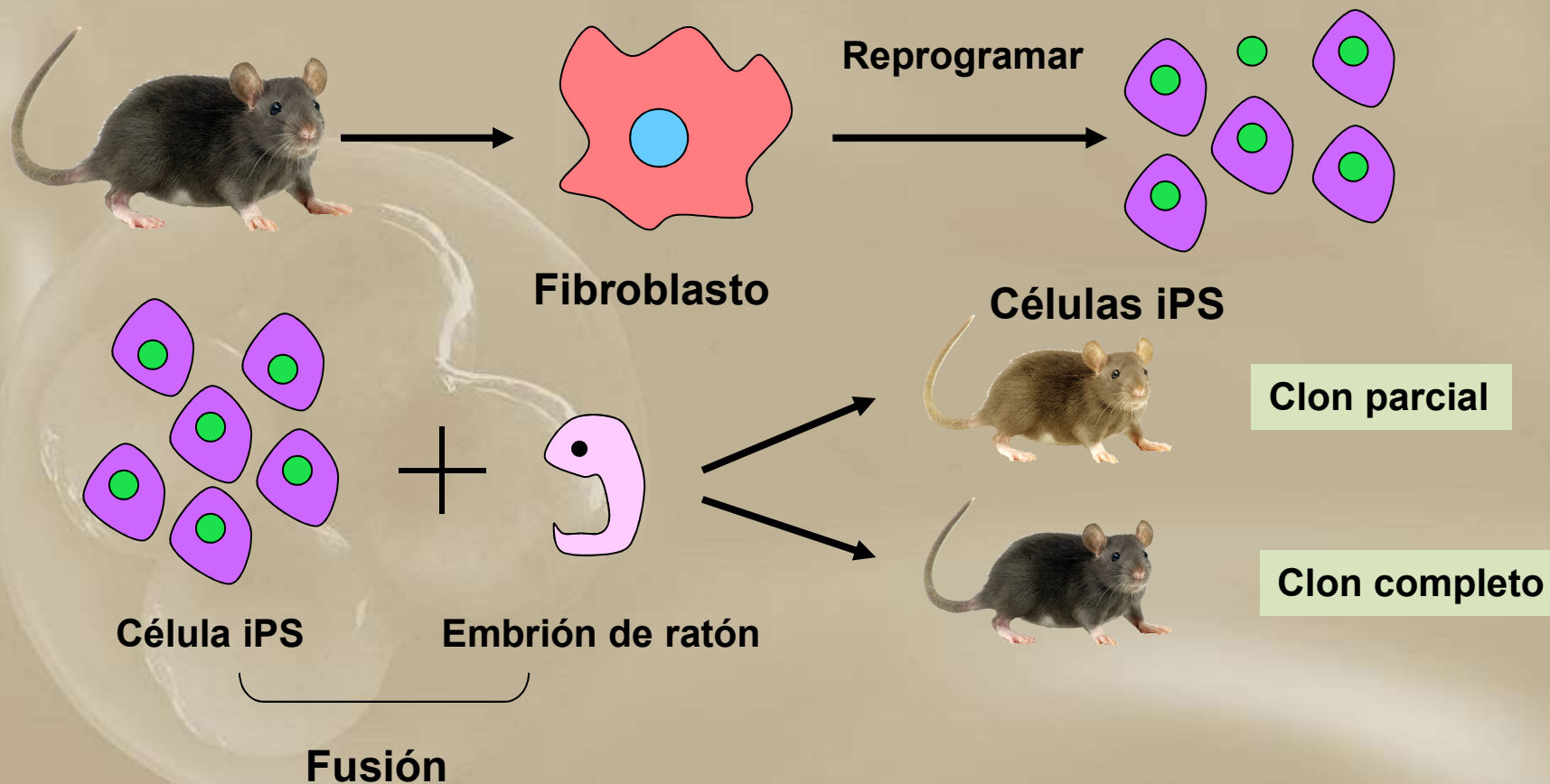
Wernig M et al. Nature 448;
318-324, 2007

Igualmente Maherali y colaboradores consiguieron reprogramar fibroblastos a células pluripotentes inducidas y a partir de ellas producir quimeras viables

Maherali N et al. Cell Stem
Cell 1; 55-70, 2007



Clonación de animales utilizando células IPS



S Connor The independent 14-IV-2008.
Experiencias del grupo de Robert Lanza de
Advanced Cell Technology



Obtención de células IPS de origen humano

A finales de 2007 Shinya Yamanaka y James Thomson, repitiendo las experiencias realizadas por el primero con células murinas obtuvieron células iPS a partir de células de piel humana

Takahashi et al. Cell 131;
861-72, 2007

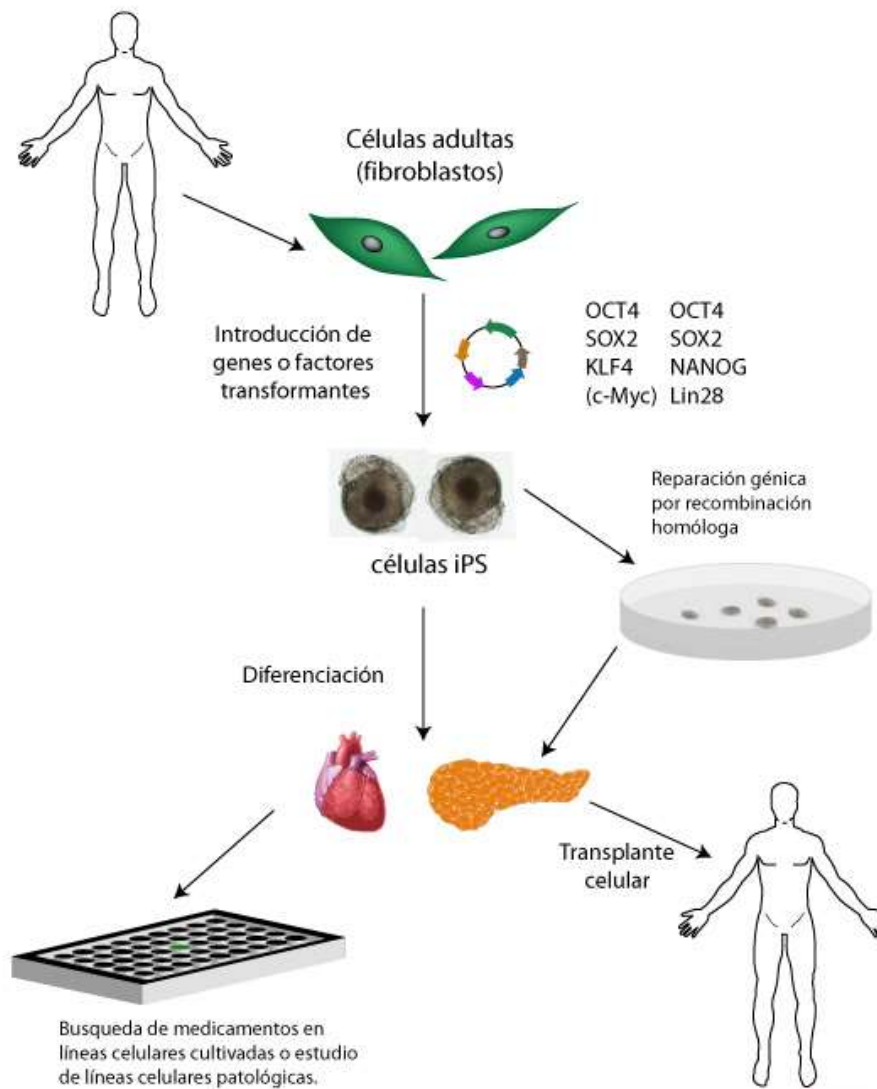
Yu et al. Science 318;1917-
20, 2007

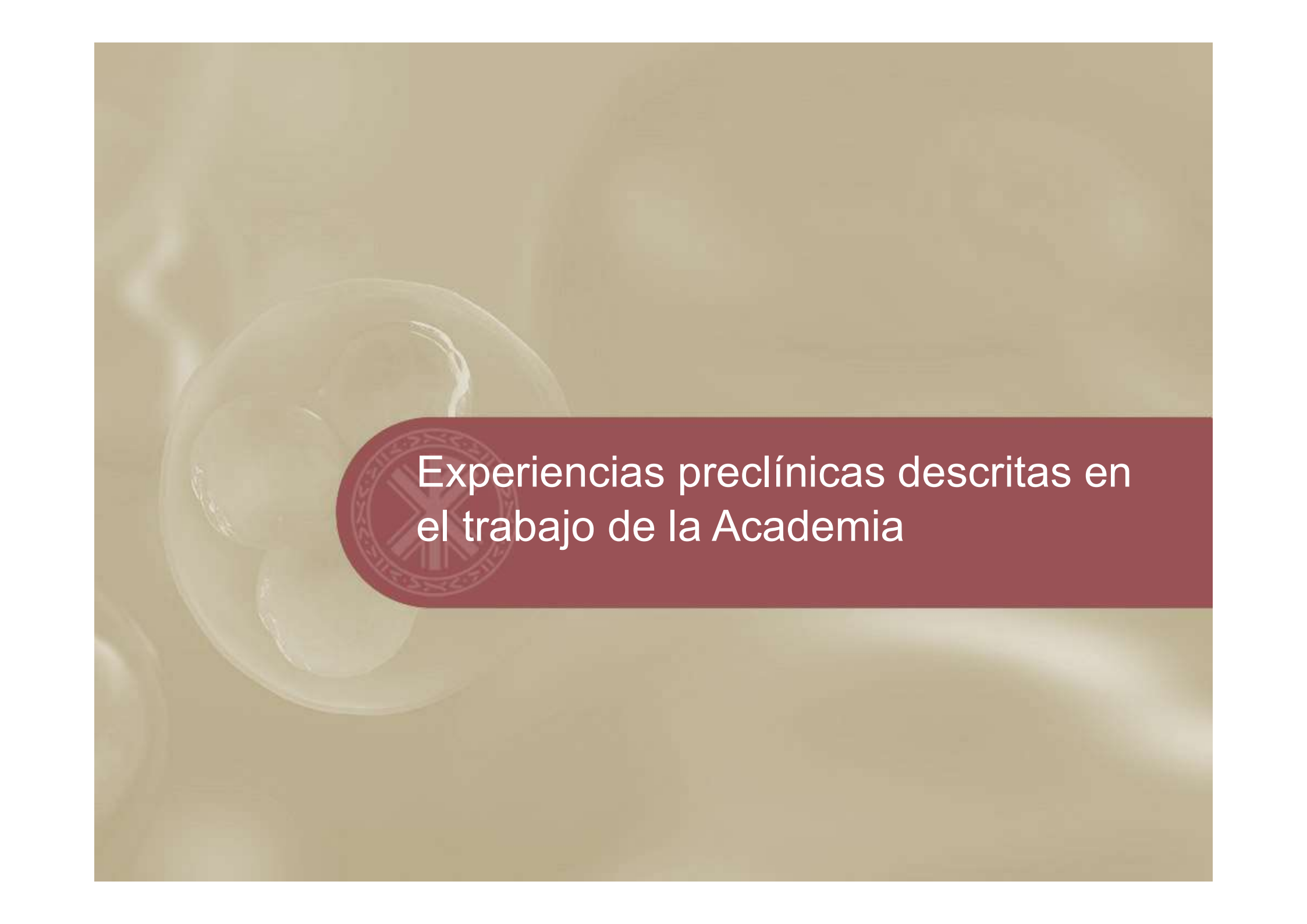
Igualmente Lowry y col en 2008 consiguieron generar células iPS a partir de fibroblastos de piel humana, pudiendo derivar de las mismas células de prácticamente todo tipo de tejidos

Lowry et al. PNAS 105;
2.883-2.888, 2008



Obtención de células IPS de origen humano



The background of the slide is a soft-focus photograph of a microscope slide containing a cell culture. A semi-transparent red banner is positioned horizontally across the middle of the slide. On the left side of this banner, there is a circular seal or logo, likely representing a university or academic institution. The text on the banner is white and reads:

Experiencias preclínicas descritas en el trabajo de la Academia



Experiencias preclínicas en ratones con anemia falciforme

Partiendo de células somáticas de ratones con anemia falciforme y tras ser corregida la anomalía genética por terapia génica molecular se generan células iPS

A partir de ellas se derivan células troncales hematopoyéticas normales que se pueden reinyectar en ratones con anemia falciforme, consiguiendo mejorar sensiblemente su cuadro clínico

Hanna J et al
Science 318; 1920-1923, 2007



Experiencias preclínicas en ratones con parkinson

Wernig y col demuestran que se pueden diferenciar células iPS en células troncales precursoras neurales que en cultivo puede generar células neurales o de glía

Si las células generadas se transfieren al cerebro de fetos de ratones, éstas migran a distintas regiones y se diferencian en glía y neuronas y neuronas dopaminérgicas

Cuando las neuronas dopaminérgicas se trasplantan a cerebro de ratas con Parkinson se consigue mejorar sus síntomas clínicos

Estos resultados demuestran el potencial terapéutico de células iPS procedentes de fibroblastos para el reemplazo de células neuronales patológicas en un modelo animal



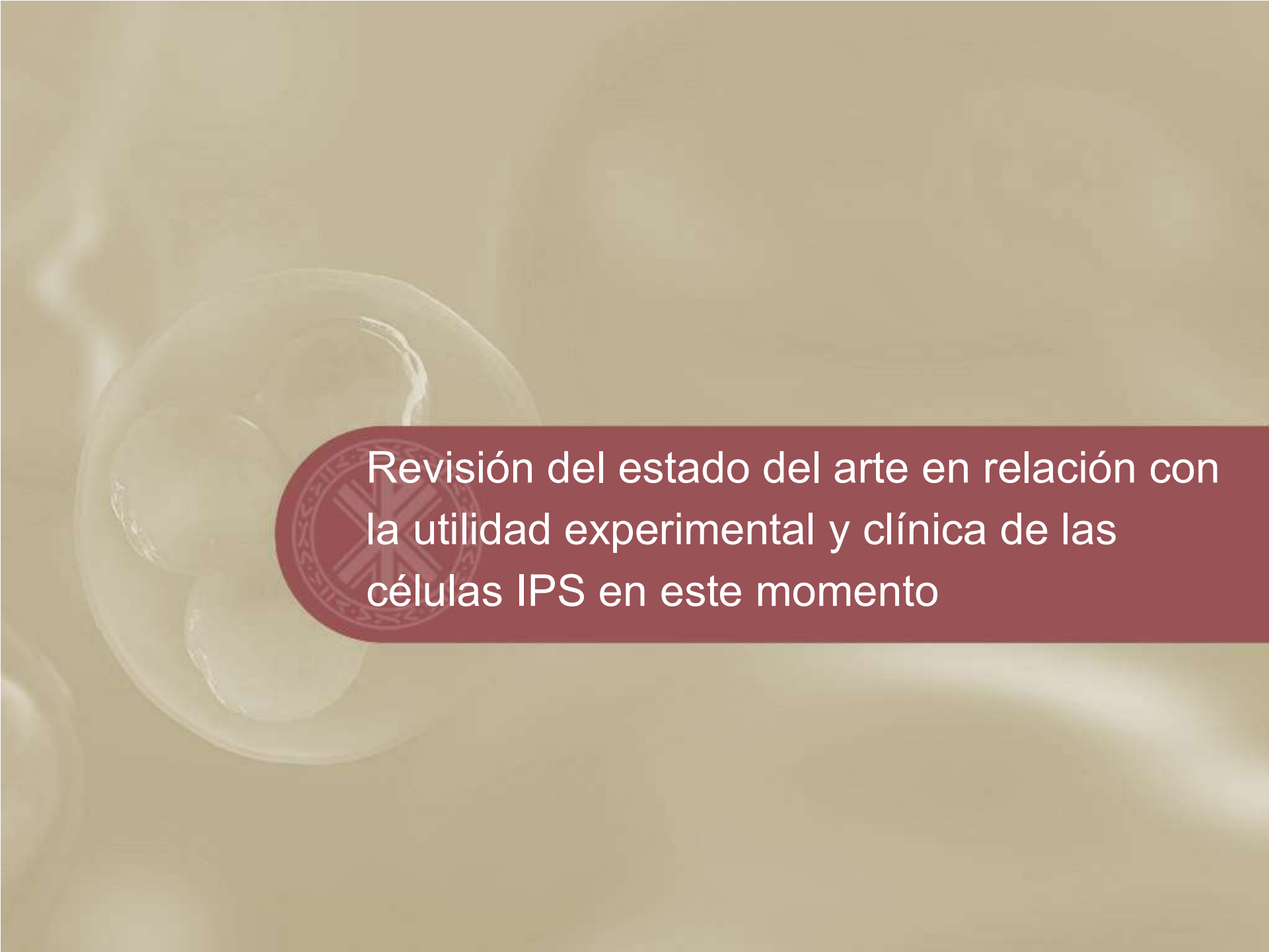
¿Pueden las células IPS sustituir a las células madre embrionarias humanas?



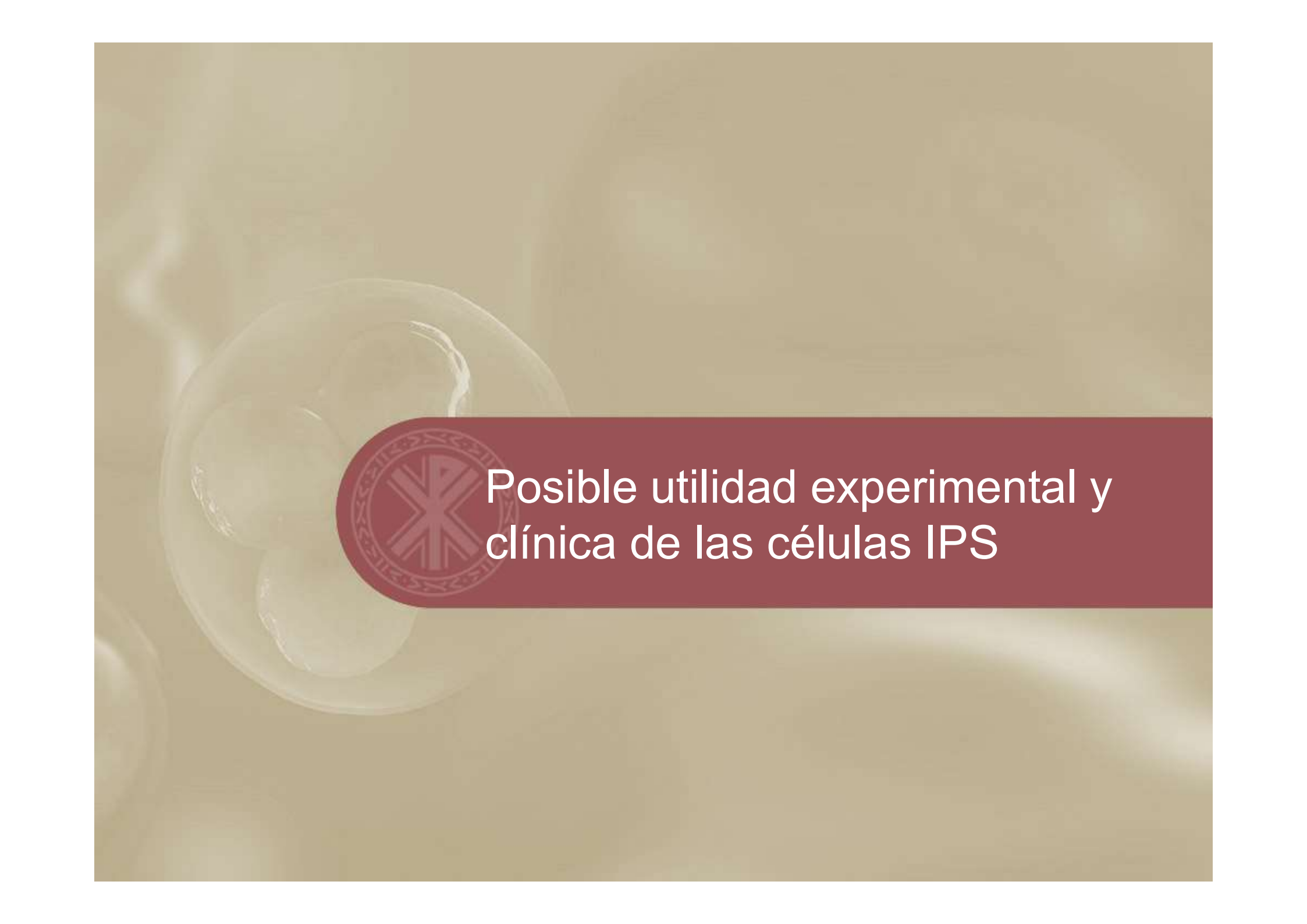
Similitud entre las células IPS y las embrionarias humanas

En un trabajo reciente se ha comprobado que las células troncales embrionarias y las células iPS son molecular y funcionalmente equivalentes y que no pueden distinguirse genéticamente. En él se compara el nivel transcriptómico y epigenético de las células iPS humanas y de células embrionarias también humanas, no encontrando tras el proceso de reprogramación diferencias objetivas por lo que concluyen que ambas células y embrionarias humanas son molecular y funcionalmente equivalentes

Choi J et al. Nature Biotechnology 2015; 33: 1173-81

A microscopic view of a cell culture dish, showing a cluster of cells. A red circular overlay is positioned over the center of the dish, containing white text. The background is a soft, out-of-focus light brown color.

Revisión del estado del arte en relación con
la utilidad experimental y clínica de las
células IPS en este momento



Posible utilidad experimental y
clínica de las células IPS



Posible utilidad de las células IPS

Para suplir la información que proporcionan las células troncales embrionarias tanto para fines experimentales como clínicos

Para estudios experimentales sobre la diferenciación celular

Para desarrollar bancos de células humanas pluripotentes de distintos haplotipos



Posible utilidad de las células IPS

Para la obtención de líneas celulares de determinadas enfermedades para profundizar en los mecanismos patogénicos de las mismas

McKernan et al. Nature Biotechnology 31; 875-7, 2013

Para poder derivar células iPS de muy diversos tejidos para ser utilizadas en el mejor conocimiento de la patogenia y en el tratamiento de diversas enfermedades

Tiscornia G et al. Nature Medicine 17; 1570-6, 2011

Zhu H et. Nature Reviews Genetics 12; 266-75, 2011

Birket M et al. Nature Biotechnology 33; 970-9, 2015

Para experimentación farmacológica y para su uso en medicina reparadora y regenerativa



Ventaja del uso de las células IPS

No se necesita la destrucción de embriones humanos para obtenerlas

Tampoco la utilización de ovocitos humanos en caso de que para producir líneas celulares se utilice la clonación humana

No inducen rechazo inmunológico pues se pueden obtener a partir de células somáticas del propio paciente

Facilidad técnica y coste reducido para conseguirlas




Inconvenientes técnicos

Posibilidad de transmisión de enfermedades víricas

Posibilidad, aunque menor, de producir tumores

Posibles problemas debido a la introducción del ADN de los genes reprogramadores en las células receptoras

MF Pera y K Hasegawa
Nature Biotechnology 26; 59-60, 2008



Experiencias preclínicas en animales



Experiencias preclínicas en ratones con hemofilia A

Adicionalmente a las dos experiencias preclínicas comentadas en el discurso de ingreso de la RAMCV, en el año 2009 se obtuvieron células iPS a partir de fibroblastos de la cola de ratones que posteriormente se diferenciaron a células endoteliales y células progenitoras endoteliales, comprobando que estas células producían factor VIII de la coagulación

Posteriormente las células endoteliales o sus progenitoras producidas se inyectaron a ratones con hemofilia A comprobándose que el factor VIII se incrementaba hasta un nivel de un 8% a 12%

Desde un punto de vista clínico se constató que los ratones trasplantados sobrevivían mucho más tiempo que los ratones del grupo control



Experiencias preclínicas en ratones con infarto de miocardio

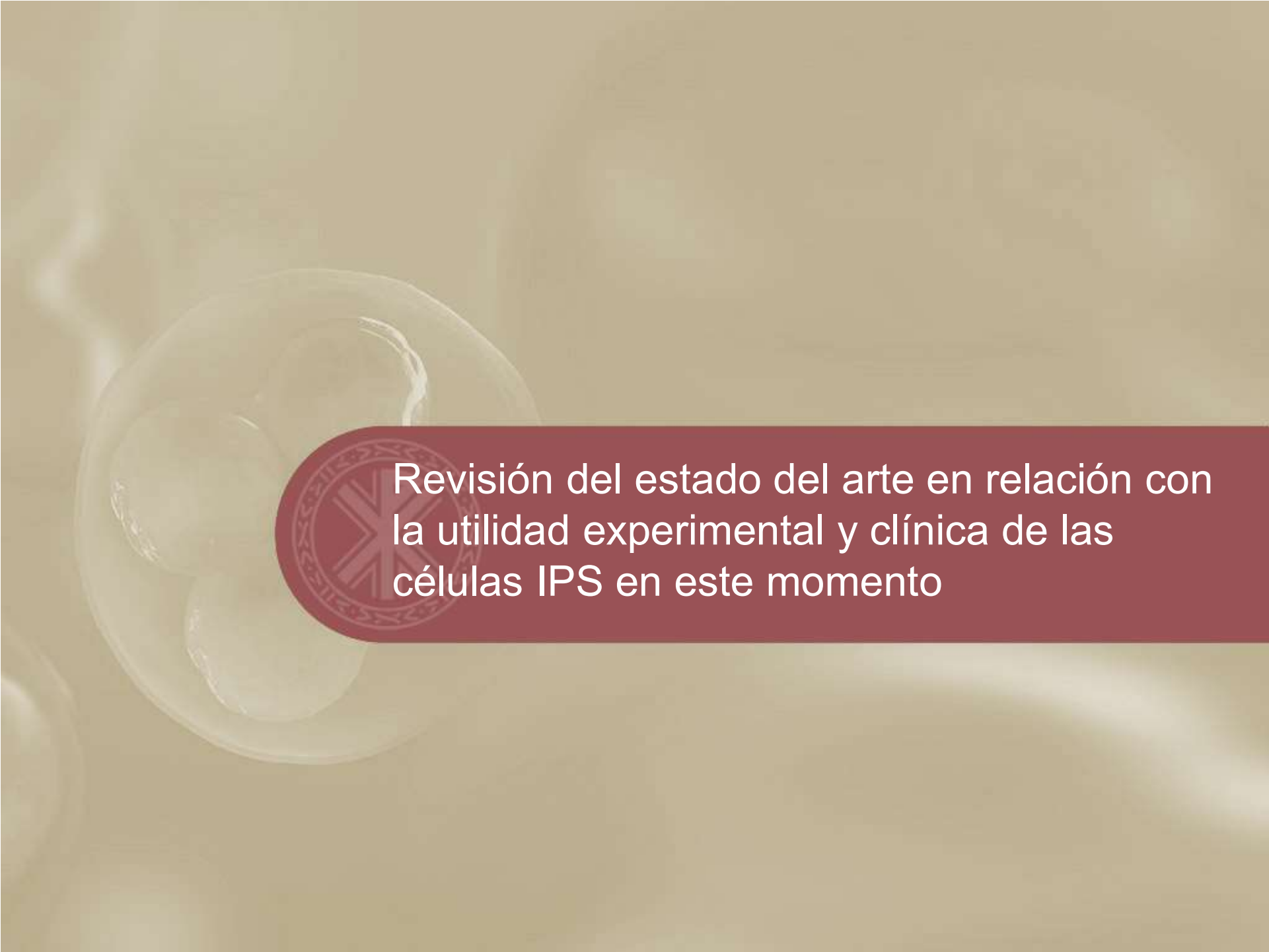
A partir de fibroblastos humanos se producen células iPS que se insertan en mórulas de ratones

De las células embrionarias de dichos ratones se pueden derivar cardiomiocitos, que se pueden transferir a corazones de ratones enfermos, consiguiendo la mejora funcional de los mismos

Lo que sugiere que las células iPS podrían ser útiles en el tratamiento de la enfermedad cardíaca

Nelson et al. Circulation 120; 408-416, 2009

Wernig M et al. PNAS 105; 5856-61, 2008

The background of the slide is a microscopic image of a cell, possibly a zygote or early embryo, showing internal structures like the nucleus and cytoplasm. A semi-transparent red circular logo is overlaid on the left side of the text box. The logo features a stylized 'X' or cross-like symbol in the center, surrounded by a circular border containing text that is not clearly legible.

Revisión del estado del arte en relación con
la utilidad experimental y clínica de las
células IPS en este momento



Revisión del estado del arte en relación con la utilidad experimental y clínica de las células IPS en este momento

Su uso se ha centrado en varios objetivos:

El primero la obtención de tipos celulares de determinadas enfermedades que permitan el estudio de sus mecanismos patogénicos

Hasta el momento se han logrado dicho tipo de células en más de 30 enfermedades distintas

McKernan et al. Nature Biotechnology 31; 875-7, 2013



Células IPS obtenidas de células adultas de distintas patologías

Tipo de enfermedad	Primer autor	Revista	Nombre de enfermedad	Causa genética	Tipo de células obtenidas	Se han evaluado fármacos
Neurológica	Soldner, F	Cell 136; 964-977, 2009	Enfermedad de Parkinson	Poligénica	Neuronas dopaminérgicas	ND
Neurológica	Nguyen, HN	Cell Stem Cell 8; 367-280, 2011	Enfermedad de Parkinson	Poligénica (con mutación LRRK2)	Neuronas dopaminérgicas	Sí
Neurológica	Dimos, JT	Science 321; 1218-1221, 2008	Esclerosis lateral amiotrófica	Poligénica	Neuronas motoras	ND
Neurológica	Ebert, AD	Nature 457; 277-280, 2009	Atrofia espinal muscular	Monogénica	Neuronas motoras	Sí
Neurológica	Lee, G	Nature 461; 402-406, 2009	Disautonomía familiar	Monogénica	Células de la cresta neural	Sí
Neurológica	Marchetto, MC	Cell 143, 527-539, 2010	Síndrome de RETT	Monogénica	Neuronas	Sí
Neurológica	Park, I	Cell 134; 877-886, 2008	Enfermedad de Huntington	Monogénica	ND	ND
Neurológica	Ku, S	Cell Stem Cell 7; 631-637, 2010	Ataxia de Friedreich	Monogénica	ND	ND
Neurológica	Quiang, L	Cell 146; 359-371, 2011	Alzheimer	Poligénica	Neuronas	No
Neurológica	Brennan, KJ	Nature 473; 221-225, 2011	Esquizofrenia	Poligénica	Neuronas glutaminérgicas	Sí



Células IPS obtenidas de células adultas de distintas patologías

Tipo de enfermedad	Primer autor	Revista	Nombre de enfermedad	Causa genética	Tipo de células obtenidas	Se han evaluado fármacos
Sangre	Raya, A	Nature 460; 53-59, 2009	Anemia de Fanconi	Monogénica	Células sanguíneas	ND
Sangre	Urbach, A	Cell Stem Cell 6; 407-411, 2010	Síndrome X frágil	Monogénica	ND	ND
Sangre	Zhaohui, Y	Blood 114; 5473-5480	Trastornos Mieloproliferativos	Poligénica	Hematopoyéticas	No
Cardiaca y muscular	Moretti, A	N Engl. Med 363; 1397-1409, 2010	Síndrome de QT 1 largo	Monogénico	Cardiomiocitos	Sí
Cardiaca y muscular	Itzhaki, I	Nature 471, 225-229, 2011	Síndrome de QT 2 largo	Monogénico	Cardiomiocitos	Sí
Cardiaca y muscular	Carvajal -Vergara, X	Nature 465; 808-812, 2010	Síndrome LEOPARD	Monogénico	Cardiomiocitos	ND
Cardiaca y muscular	Yazawa, M	Nature 471; 230-234, 2011	Síndrome Timothy	Monogénico	Cardiomiocitos	Sí
Cardiaca y muscular	Zhang, J	Cell Stem Cell 8; 31-45, 2011	Progeria de Hutchinson Gilford	Monogénico	Células musculares lisas, células madre mesenquimales	ND
Cardiaca y muscular	Liu, GH	Nature doi:10.1034/nature09879	Progeria de Hutchinson Gilford	Monogénico	Células musculares lisas	ND
Cardiaca y muscular	Park, IH	Cell 134; 877-886, 2008	Distrofia muscular de Duchenne	Monogénico	ND	ND



Células IPS obtenidas de células adultas de distintas patologías

Tipo de enfermedad	Primer autor	Revista	Nombre de enfermedad	Causa genética	Tipo de células obtenidas	Se han evaluado fármacos
Pancreática	Maehr, ST	Procl Natl Acad Sci	Diabetes tipo 1	Poligénica	Células Productoras de insulina y glucagón	ND
Hepática	Rashid, ST	J. Clin. Invest. 120; 3127-3136, 2010	Deficiencia de A1 antitripsina	Monogénica	hepatocitos	Sí
Otras	Agarwal, S	Nature 464; 292 298, 2010	Disqueratosis	Monogénica	iPS	No
Otras	Yang, J	J. Biol. Chem 285; 40303-40311, 2010	Síndrome de Prader-Willi	Monogénica	Neuronas	ND
Otras	Chamberlain, SJ	Proc. Natl Acad. Sci USA 107; 17668 17673, 2010	Síndrome de Angelman y Prader-Willi	Monogénica	Neuronas	ND
Otras	Park, IH	Cell 134; 877-886, 2008	Síndrome de Down	Monogénica	ND	ND



Revisión del estado del arte en relación con la utilidad experimental y clínica de las células IPS en este momento

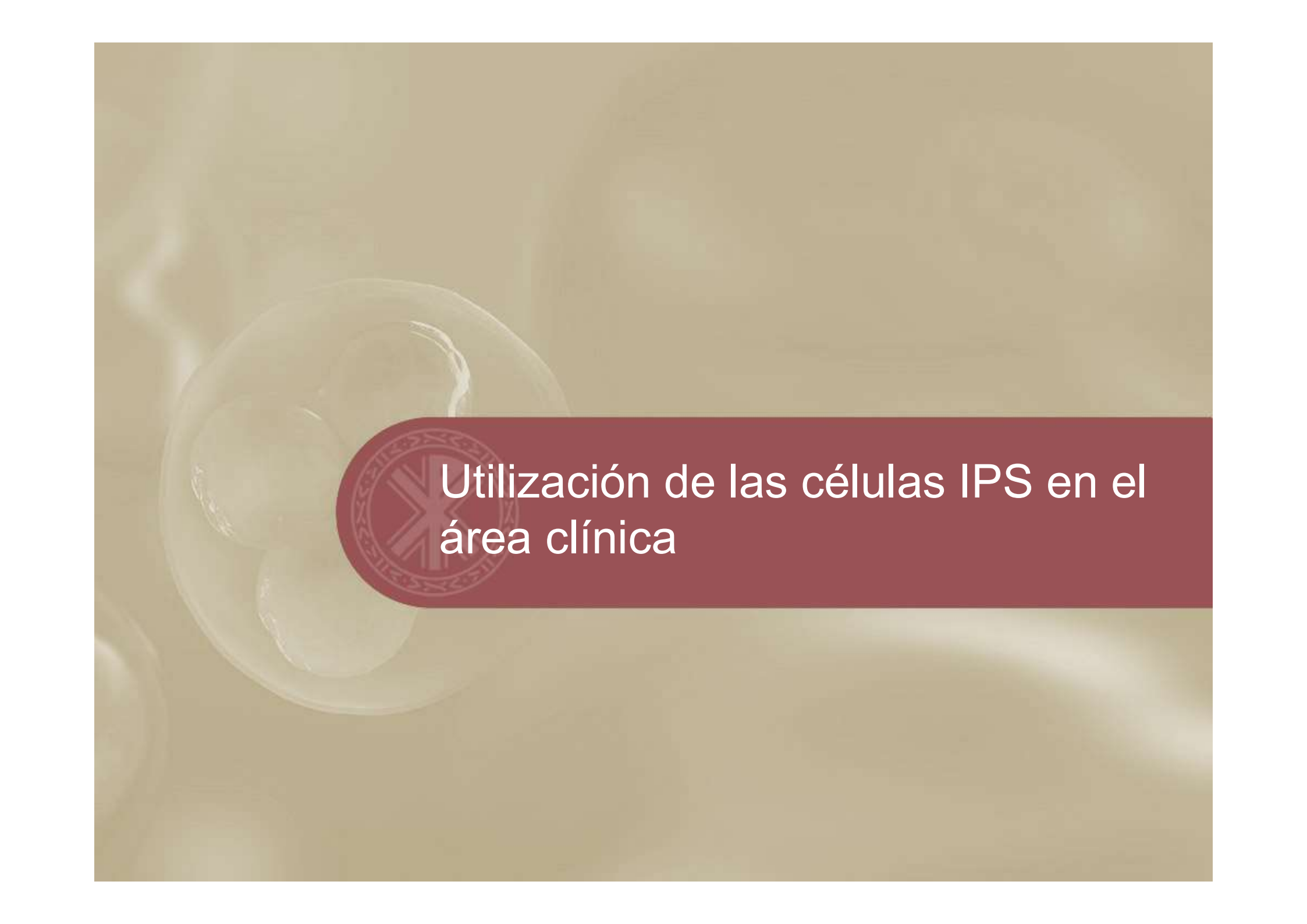
El segundo objetivo es tratar de utilizarlas para derivar células de distintos tipos de tejido que puedan ser usadas en la medicina reparadora y regenerativa

Hasta ahora se han podido diferenciar numerosos tipos de células somáticas de animales adultos a partir de las células iPS

Tiscornia G et al. Nature Medicine 17; 1570-6, 2011

Zhu H et. Nature Reviews Genetics 12; 266-75, 2011

Birket M et al. Nature Biotechnology 33; 970-9, 2015



Utilización de las células IPS en el
área clínica



Utilización de las células IPS en el área clínica

En el área clínica la utilización de las células iPS está aun distante de dar resultados positivos pues hasta el momento solo se ha iniciado un ensayo clínico con estas células dirigido a tratar la degeneración macular asociada a la edad, desarrollado en el Instituto RIKEN de Kobe, Japón

Kamao H et al. Stem Cell Reports 2; 205-18, 2014



Utilización de las células IPS en el área clínica

Sin embargo dicho ensayo ha sido suspendido por la aparición de mutaciones potencialmente oncogénicas en las células producidas

A la vista de ello las autoridades niponas han impuesto nuevas restricciones a la realización de ensayos clínicos con células iPS lo que añade una dificultad más al uso de éstas en la clínica humana

Garber K. Nature Biotechnology 33; 890-1, 2015



Nuevas posibilidades de uso



Nuevas posibilidades de uso

Una nueva posibilidad que se abre en el uso de células iPS es su utilización conjunta con terapia génica lo que permitirá modificar en las células somáticas de las que se obtienen las iPS las posibles alteraciones genéticas que puedan presentarse

Una vez se hayan subsanado éstas, se podrán derivar células iPS normales que podrán diferenciarse a distintos tipos celulares



Nuevas posibilidades de uso

Una posibilidad incluso más atractiva que se ofrece es combinar la reprogramación celular con la edición genética, utilizando la metodología CRISPR-Cas 9 que permite de una forma sencilla y económica modificar el genoma humano para tratar de eliminar las alteraciones genéticas de distintas enfermedades

Utilizando esta técnica se pueden generar células iPS con la alteración genética corregida de las que se pueden derivar líneas celulares para el tratamiento de la enfermedad originaria

Hotta A et al. Annual Review of Genetics 49; 47-70, 2015

Park C et al. Cell Stem Cell 17; 213-220, 2015



Nuevas posibilidades de uso

También se puede utilizar el sistema TALEN, basado en la utilización de nucleasas modificadas para la obtención de células iPS normales, técnica que ya ha sido utilizado en diversos ensayos clínicos

Osborn M et al. Mol Ther 21; 1151-9, 2013

Ma N et al. J Biol Chem 288; 34671-9, 2013



Nuevas posibilidades de uso

Un atrayente campo para la utilización futura de las células iPS es para la producción de órganos humanos en animales, lo que de alguna forma podría contribuir a solventar la escasez de órganos humanos para trasplantes

En una reciente publicación se ha logrado esto en ratas, trasplantándoles células troncales embrionarias humanas obtenidas de la masa granulosa interna de blastocistos humanos o células iPS así mismo obtenidas de células somáticas adultas

ARTICLE

doi:10.1038/nature14413

An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency

Jun Wu^{1*}, Daiji Okamura^{2,4*}, Mo Li¹, Keichiro Suzuki¹, Chongyuan Luo^{2,3}, Li Ma¹, Yupeng He¹, Zhongwei Li¹, Chris Benner⁴, Isao Tamura¹, Marie N. Krause², Joseph R. Nery³, Tingting Du¹, Zhuzhu Zhang¹, Tomoaki Ishihata¹, Yuta Takahashi^{1,6}, Emi Akazawa¹, Na Young Kim¹, Jeronimo Lajara¹, Pedro Guillen^{7,8}, Josep M. Campistol⁹, Concepcion Rodriguez Esteban¹, Pablo J. Ross¹⁰, Alan Saghatelian¹¹, Bing Ren¹, Joseph R. Ecker^{2,3} & Juan Carlos Izpisua Belmonte¹

Pluripotency, the ability to generate any cell type of the body, is an evanescent attribute of embryonic cells. Transitory pluripotent cells can be captured at different time points during embryogenesis and maintained as embryonic stem cells or epiblast stem cells in culture. Since ontogenesis is a dynamic process in both space and time, it seems counterintuitive that these two temporal states represent the full spectrum of organismal pluripotency. Here we show that by modulating culture parameters, a stem-cell type with unique spatial characteristics and distinct molecular and functional features, designated as region-selective pluripotent stem cells (rsPSCs), can be efficiently obtained from mouse embryos and primate pluripotent stem cells, including humans. The ease of culturing and editing the genome of human rsPSCs offers advantages for regenerative medicine applications. The unique ability of human rsPSCs to generate post-implantation interspecies chimaeric embryos may facilitate our understanding of early human development and evolution.

Two types of pluripotent stem cells (PSCs) have been captured from early mouse embryos. Embryonic stem cells (ESCs) derived from the inner cell mass (ICM) of a pre-implantation blastocyst^{1,2} resemble naive epiblast³, and epiblast stem cells (EpiSCs) established from post-implantation epiblast are probably the *in vitro* counterparts of anterior primitive-streak cells^{4,5}. While both are pluripotent, they bear striking differences in molecular signature, signalling dependency, colony morphology, cloning efficiency, metabolic requirements and epigenetic features^{6,7}, which together with their ability to re-enter embryogenesis at different developmental time points (pre-implantation versus post-implantation, respectively) distinguish ESCs and EpiSCs as existing in two temporally distinct pluripotent states.

After embryo implantation, signals from regionalized extra-embryonic tissues guide pluripotent epiblast cells through dynamic changes to initiate the embryonic body plan that accommodates the diversified developmental fates that ensue upon gastrulation⁸. Heterotopic grafting experiments indicate that epiblast cells, regardless of their regional origins, can adopt the developmental fate characteristic of the cell population at the site of transplantation, illustrating their highly plastic nature⁹. Nonetheless, it is conceivable that epiblasts are subjected to regional influences and bear a multitude of pluripotent states with distinguishable molecular and functional signatures¹⁰. To date it remained unknown whether PSCs with distinct spatial identities could be stabilized in culture. By carefully examining the cellular response of the epiblast to different *ex vivo* environmental stimuli, we have isolated, with high efficiency, a stable primed pluripotent cell type from both pre- and post-implantation epiblasts that differs from EpiSCs in cloning efficiency, cell growth kinetics, transcriptomic, epigenomic and metabolic profiles. Notably, the newly identified PSCs selectively

colonize the posterior region of post-implantation embryos and allow for efficient generation of *ex vivo* intra- and interspecies chimaeric embryos. Our study not only uncovers a novel spatially defined pluripotent cell type, but also opens up a new avenue for comparing early developmental programs across species.

Optimizing epiblast culture parameters

FGF2/Activin A (FA) signalling supports the derivation of EpiSCs^{11,12}. While deriving EpiSCs using a FA-based medium¹³, we observed cellular differentiation started around day 3 and by day 4 only a few undifferentiated epiblast cells remained (Fig. 1a, b and Extended Data Fig. 1a, b). This suggested to us that the pluripotent state of most of the cells present across the *in vivo* epiblast could not be maintained by FA signalling. The canonical Wnt signalling pathway also has an important role in EpiSC self-renewal^{14,15}. We tested the effect of a Wnt inhibitor IWR1 on epiblast explants. Isolated ES.75 epiblasts were cultured in a serum-free N2B27 medium¹⁶ on mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts (MEFs) supplemented with IWR1 (N2B27^{IWR1}) (Fig. 1a, b). After 4 days in culture, we found the number of SSEA-1⁺/OCT4⁺ cells dramatically increased in N2B27^{IWR1} compared to FA-based medium (Extended Data Fig. 1b). However, a significant fraction of SSEA-1⁺/OCT4⁺ cells was still detected. Next we tested the combination of either Activin A/IWR1 (N2B27^{AA/IWR1}) or FGF2/IWR1 (N2B27^{FGF2/IWR1}). Notably, while a comparable level of differentiation was observed in N2B27^{AA/IWR1} versus N2B27^{FGF2}, day 4 epiblast outgrowths in N2B27^{FGF2} showed homogeneous morphology and little-to-no differentiation (Fig. 1b, c and Extended Data Fig. 1b, c). Mechanistically, the combination of the serum-free N2B27 medium, IWR1 and FGF2 suppressed lineage

¹The Salk Institute for Biological Studies, Genomic Epidemiology Laboratory, La Jolla, California 92037, USA; ²Howard Hughes Medical Institute, The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, California 92037, USA; ³The Salk Institute for Biological Studies, Genomic Epidemiology Laboratory, La Jolla, California 92037, USA; ⁴The Salk Institute for Biological Studies, Genomic Epidemiology Laboratory, La Jolla, California 92037, USA; ⁵Center for Gene and Cell Biology, University of California San Diego School of Medicine, Department of Cellular and Molecular Medicine, 3636 La Jolla Village Drive, San Diego, California 92161, USA; ⁶USC Stem Cell Center, The USC Advanced Research Institute, University of the Arts, 1-1-1 Tennoji-4, Suita, Osaka, 565-0871, Japan; ⁷Instituto de Medicina, Universidad Carlos III de Madrid, Calle Arzobispo Morcillo, 45, 28042 Madrid, Spain; ⁸Hospital Clinic de Barcelona, Carrer Vilanova, 171, 08036 Barcelona, Spain; ⁹University of California, Davis, Davis, California 95616, USA; ¹⁰The Salk Institute for Biological Studies, Physics Biology Laboratory, La Jolla, California 92037, USA; ¹¹Howard Hughes Medical Institute, Department of Advanced Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, 3327-204 Naniwa-cho, Naniwa-ku, 591-8505, Japan; ¹²The authors contributed equally to this work.



Nuevas posibilidades de uso

Pero esta técnica conlleva importantes dificultades éticas por la posibilidad de que se generen neuronas humanas en el animal trasplantado y se desarrolle tejido nervioso humano o que se generen células sexuales y conseguir concebir un embrión humano en un embrión quimérico

Sharma A et al. Science 350; 640, 2015



Creación de quimeras humano-animal. Apoyo financiero

Pocos proyectos de investigación han tenido una ayuda económica tan destacada como el proyecto que se está comentando, pues los NIH de Estados Unidos dedicar un fondo de 500.000 dólares anuales durante 5 años para llevarlas a cabo

Pero dados los problemas éticos que suscitaban el 23 de septiembre de 2015 los NIH comunicaron a Izpisúa dejaba de financiar sus experiencias hasta que la Agencia revisase a fondo las investigaciones que se estaban llevando a cabo, instando a científicos y bioéticos destacados a una reunión del 6 de noviembre de ese mismo año para evaluar el tema



Creación de quimeras humano-animal. Apoyo financiero

Sin embargo algunos autores se mostraron partidarios de proseguir con ellas



Creación de quimeras humano-animal. Experiencias del grupo de Izpisua

Pero dado el potencial que estas experiencias podían tener un grupo de expertos bioéticos y científicos de la Facultad de Medicina de la Universidad de Stanford enviaron una carta a los NIH para que revocara la orden de retirar los fondos para las investigaciones de Izpisua

La carta fue publicada en Science el mismo 6 de noviembre, es decir el mismo día en que se iba a reunir el grupo de expertos para valorar los problemas éticos que estas investigaciones suscitan

Stanford University Medical Center 5 nov 2015



Creación de quimeras humano-animal. Solicitud de moratoria

Pero a la vez que todo esto ocurría, el “International Bioethics Committee” hizo un llamamiento para promover una moratoria para el uso de la edición genómica que pueda modificar las líneas germinales humanas

Phys.org 7-x-2015



Creación de quimeras humano-animal. Nuevas experiencias

Otro objetivo sería, producir animales carentes de un órgano para ser sustituido por el producido a partir de las células troncales embrionarias o células iPS trasplantadas al animal en cuestión

www.ucam.edu/consiguen-generar-tejidos-y-organos-en-animales



Creación de quimeras humano-animal. Nuevas experiencias del grupo de Izpisua

Con este objetivo el mismo grupo de Izpisua ha editado 392 cigotos en los que han eliminado el gen responsable de la producción de las células β -pancreáticas, las productoras de insulina.

A dichos animales se les inyectaron células troncales embrionarias humanas o células iPS para que proliferaran en el lugar del órgano ausente y así producir el órgano deseado, que aunque inserto en un animal tendría un genoma prácticamente humano.

Yoshihara, E et al. Cell Metabolism 23; 622–634, 2016

Hasta hora comenta Pedro Guillén, coautor del trabajo que «hemos creado siete cerditos con páncreas humanizados»

Valenzuela, A. Papel. 4-07-16

También están experimentando con otros 4 tipos de tejidos y órganos: cartílago, córnea, páncreas y riñón



Últimas experiencias del grupo de Izpisua

El pasado julio la periodista América Valenzuela publicaba un artículo con el título «el próximo trasplante será de cerdo». En él se comentaban las experiencias que Izpisúa está realizando

Ante la posibilidad de que dicha periodista tuviera más información sobre dichas experiencias nos pusimos en contacto con ella para poder puntualizar si dichas experiencias se habían realizado con células embrionarias o células iPS

Con fecha 7 de mayo de 2016 nos contestaba, en correo privado, que había consultado el tema directamente con los expertos implicados en la investigación, Guillén e Izpisúa, y le habían comentado que dentro de poco se iba a publicar un nuevo artículo con nuevos detalles al respecto. Nosotros no hemos podido constatar que ese artículo haya ya sido publicado



Situación actual



Situación actual. Aspectos médicos a solucionar

La existencia de reprogramaciones incompletas, lo que puede depender del tipo de células somática utilizada para ser reprogramada

Kim et al. Nature Biotechnology 29; 1117-9, 2011

La baja eficiencia de las técnicas empleadas, especialmente en lo que hace referencia al porcentaje de células obtenidas tras los procesos de diferenciación, pues ello constituye una dificultad para su aplicación clínica

Patsch C et al. Nature Cell Biology 17; 994-1003, 2015

El fenómeno de la mutagénesis, posiblemente debido a la inserción de genes exógenos codificantes de los factores de transcripción que pueden producir tumores en las células utilizadas

Selvaraj V et al. Trends Biotechnol 28; 214-23, 2011



Situación actual

En resumen, a nuestro juicio se puede afirmar que actualmente siguen las incertidumbres sobre el uso de las células iPS pues no se conocen bien los mecanismos moleculares que gobiernan la reprogramación celular ni tampoco las condiciones técnicas más adecuadas para obtenerlas. Por ello, el uso de células iPS sigue siendo una esperanzadora posibilidad terapéutica, pero habrá que esperar unos años para que las células iPS se utilicen habitualmente en la clínica médica.



¡Gracias...!