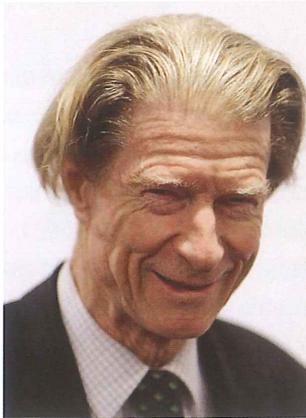


Premio Nobel de Fisiología y Medicina 2012

SISTEMA INMUNE

Juan José Aragón Reyes
y María Cascales Angosto



John B. Gurdon



Shinya Yamanaka

La Asamblea Nobel del Instituto Karolinska de Estocolmo resolvió otorgar el Premio Nobel en Fisiología y Medicina 2012 al investigador británico John B. Gurdon y al científico japonés Shinya Yamanaka por sus investigaciones pioneras en clonación de organismos y células madre. En el comunicado de la Asamblea Nobel que anuncia la concesión del premio, se destaca: “Estos descubrimientos han revolucionado nuestros conocimientos sobre el desarrollo de las células y los organismos y han creado nuevas oportunidades para investigar enfermedades y desarrollar métodos para diagnósticos y terapias”.

John Gurdon, de la Universidad de Cambridge (Reino Unido), sentó las bases de la clonación de organismos con sus experimentos realizados en ranas en 1962. Sus investigaciones fueron clave para la clonación de la oveja Dolly y de toda una plétora de mamíferos de otras especies.

Yamanaka, de la Universidad de Kioto, realizando investigaciones con células madre, llegó a demostrar en 2006 cómo se pueden obtener las llamadas células madre

renciadas se define por su compromiso en un linaje particular. Las células madre embrionarias derivadas de la masa interna de los blastocistos tienen la capacidad de crecer indefinidamente manteniendo su pluripotencia. Estas propiedades han hecho concebir expectativas de que las células madre embrionarias pudieran ser útiles para estudiar los mecanismos de la enfermedad y probar en ellas los fármacos efectivos, al objeto de tratar pacientes con enfermedades tales como la diabetes juvenil o lesiones en la columna vertebral, entre otras. El uso de embriones humanos se enfrenta con razonamientos éticos que impiden la aplicación de las células madre embrionarias humanas. Por otra parte, sería difícil generar células embrionarias específicas para un paciente o enfermedad. Un camino para evitar estos problemas era inducir el estado pluripotente en células somáticas del propio paciente por medio de la reprogramación directa. Yamanaka demostró que células madre pluripotentes podían ser generadas a partir de fibroblastos embrionarios de ratón y fibroblastos *tail tip* de ratón adulto, por transfección mediada por retrovirus, de los cuatro factores de transcripción por él descubiertos, Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4.

Todo ser vivo procede de células procedentes a su vez de un óvulo fertilizado o cigoto. El desarrollo embrionario comienza en el cigoto donde se combinan los genomas paterno y materno. Durante los primeros días después de la fertilización, el embrión consiste en unas pocas células inmaduras, células madre totipotentes, cada una de las cuales es capaz de originar todos los tipos de células que conforman un organismo adulto.

Los organismos multicelulares cuentan con diversas clases de tejidos, los cuales están formados por conjuntos de células especializadas que comparten la misma función. Las células de un tejido determinado son muy diferentes a las células de otros tejidos. Por ejemplo, una célula sanguínea y una neurona cardíaca difieren en forma, localización, función, interacción con otras células, etc. Sin embargo, las secuencias de DNA en los cromosomas de ambas células, son idénticas. Si en los genes se deposita la información de *cómo* debe ser y desarrollarse un individuo, y ambas células tienen exactamente los mismos genes con exactamente las mismas secuencias, ¿qué es entonces lo que las hace diferentes? La respuesta está en la *diferenciación celular* (figura 1).

Las células madre, o células troncales, son células indiferenciadas capaces de autorrenovarse y de generar uno o más tipos de células diferenciadas. Cada célula tiene una “madre” de quien procede y una línea de antepasados cada vez menos diferenciados, siendo los antepasados últimos las células del embrión temprano. La célu-

la madre es aquella célula en posesión de dos propiedades: *autorrenovación*, capacidad de sufrir numerosos ciclos de división celular sin perder su estado no diferenciado, y *potencia*, la capacidad de diferenciarse en los diversos tipos de células especializadas que van a dar lugar a la gran variedad de tejidos. Se conoce como potencialidad de una célula madre su capacidad para originar células diferentes. Una célula madre es totipotente si puede dar origen a todas las células de un organismo, pluripotente si puede originar células de todos los tejidos, y multipotente si sólo puede dar lugar a las diversas células de un mismo tejido (figura 1).

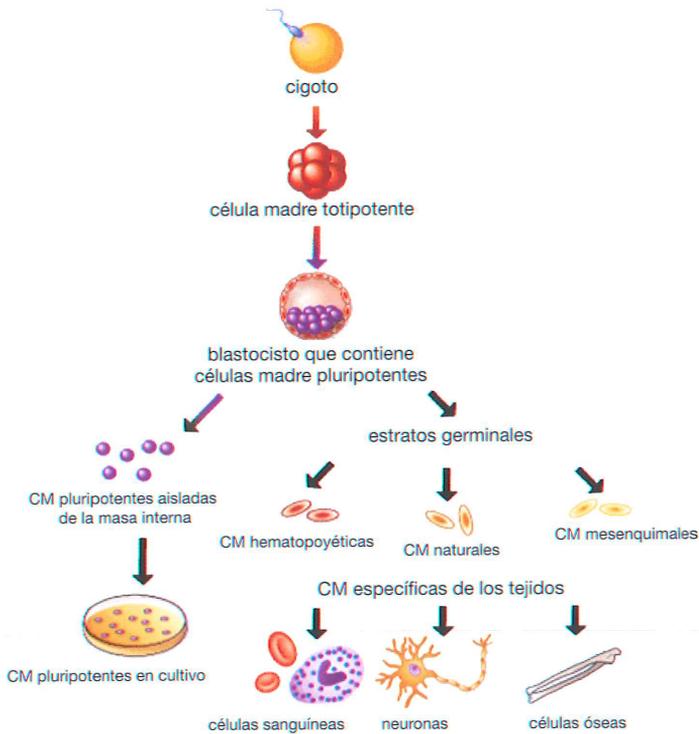


Figura 1. Diferenciación celular. El esquema muestra cómo las células madre, en este caso de un embrión animal, pueden dar origen a los diferentes tejidos de este organismo.

Las células madre totipotentes son las producidas en las primeras divisiones del huevo fertilizado, que pueden diferenciarse en todos los tipos celulares embrionarios y extraembrionarios. Las pluripotentes son descendientes de las totipotentes y pueden diferenciarse en todas las células derivadas de cualquiera de los tres estratos germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). Las multipotentes, que derivan de las plu-

ripotentes, son las que producen células de una familia cercana, como las hematopoyéticas (eritrocitos, linfocitos, plaquetas, etc.). Las células madre embrionarias son pluripotenciales, mientras que las células madre adultas son multipotenciales.

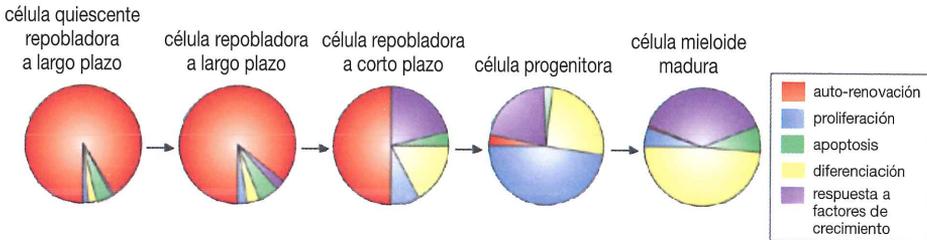


Figura 2. El estado de las células cambia de manera ordenada a medida que las células se diferencian a partir de una célula quiescente repobladora a largo plazo. La alteración del orden de este proceso puede permitir que una célula diferenciada se convierta en célula madre. (Scadden, 2004, con modificaciones).

La clave de la diferenciación celular no está en qué genes se encuentran en sus cromosomas, sino en cuáles de ellos se expresan. La regulación del patrón de la expresión génica, es decir, la decisión de cuáles se expresan y cuáles no, está gobernada por factores exógenos y endógenos. A estos factores en conjunto se les conoce como factores epigenéticos. Los factores epigenéticos pueden ser proteínas y RNA presentes en la célula, que regulan la síntesis de otras proteínas (factores endógenos), o señales externas a la célula tales como hormonas enviadas desde otra parte del cuerpo o incluso entes tan ajenos como la radiación solar o la interacción de un organismo con otro (factores exógenos).

Como se ha comentado con anterioridad, en el pasado se asumía que una célula, una vez diferenciada, no podía volver hacia un estado más temprano de su desarrollo, es decir, no había marcha atrás ya que el proceso de diferenciación era irreversible, diferenciación terminal. Se consideraba que la célula madre, estimulada por un factor externo, disparaba una serie de mecanismos epigenéticos internos de la célula, que ayudaban a mantener la diferenciación en dicha célula y que, a su vez, permitía que se transmitiera de generación en generación a las células hijas, incluso cuando la señal externa había cesado. Una vez diferenciada tenía que mantenerse en este estado por el resto de su existencia.

Los descubrimientos de Gurdon y Yamanaka han echado por tierra estos conceptos al descubrir que las células diferenciadas y maduras pueden revertir su proceso de

diferenciación, pueden desdiferenciarse y volver de nuevo a ser células madre tipo embrionario, mediante el proceso de reprogramación (figura 2).

■ Breve historia de la reprogramación

Hace apenas un siglo se sabía muy poco acerca de la naturaleza del material genético y de su influencia en el desarrollo. Se creía que los diferentes tipos celulares, a medida que se diferenciaban, perdían factores que no necesitaban y solamente retenían aquellos que les eran necesarios para realizar su función. Hans Spemann, embriólogo alemán (Premio Nobel en 1935), ya en la primera mitad del siglo XX, comenzó a discrepar acerca de la pérdida de factores genéticos y postuló entonces que la diferenciación celular debía progresar mediante un uso diferencial de dichos factores, sin necesidad de perder ninguno. Cada tipo celular sería el resultado de una programación diferente que sería el origen de las distintas funciones celulares. Spemann ya vislumbró que utilizando el núcleo de una célula adulta se podría reconstruir un embrión en el inicio del desarrollo, embrión con capacidad de originar un nuevo organismo. De demostrarse esta idea, se verificaría el potencial pluripotencial de la célula diferenciada inicial. Hans Spemann no pudo abordar el experimento, por las limitaciones técnicas de su época. Fueron Robert Briggs y Thomas King quienes, en 1952, consiguieron desarrollar la transferencia nuclear y establecieron la técnica de transferencia de núcleos de células somáticas (SCNT) o “clonación”. Con esta técnica pudieron probar el potencial de los núcleos aislados de embriones tardíos y de renacuajos, trasplantándolos en oocitos enucleados.

Por tanto, el descubrimiento de la pluripotencia inducida representa la consecuencia del desarrollo científico y tecnológico llevado a cabo a lo largo de los sesenta últimos años, y gracias a estas investigaciones se ha llegado a la demostración por SCNT, de que las células diferenciadas retienen la misma información genética que las células embrionarias. Con las técnicas actuales, que permiten cultivar y estudiar líneas celulares pluripotenciales, se ha llegado a la observación de que los factores de transcripción son los determinantes del destino celular cuya forzada expresión puede convertir un tipo celular en otro.

El trabajo de Briggs y King estableciendo la técnica de SCNT, junto con los experimentos seminales de Gurdon, demostraron que el desarrollo impone cambios reversibles durante la diferenciación celular. Consecuencia de estos estudios fue la clonación de la oveja Dolly y otros mamíferos partiendo de células adultas, como ya se ha dicho,

que demostraron que las células diferenciadas terminales permanecían genéticamente totipotentes y podían ser capaces de originar un organismo completo.

Fue en 1962 cuando John Gurdon, del Departamento de Zoología de la Universidad de Oxford, demostró, por vez primera, la pluripotencia potencial en células diferenciadas, utilizando la rana africana *Xenopus laevis*, antes mencionada. En su trabajo clave, Gurdon utilizó núcleos de células intestinales de renacuajos para reconstruir embriones y con ellos obtuvo nuevos renacuajos y hasta ranas adultas, con diversas anomalías, que resultaron ser estériles. En 1966, completó el experimento logrando obtener ranas adultas fértiles a partir de estos núcleos de células de renacuajos. Ambos artículos no tuvieron, en realidad, un gran impacto en la comunidad científica de entonces.

No fue hasta treinta años más tarde, en 1997, con el nacimiento de la oveja *Dolly*, conseguido por los científicos escoceses del Instituto Roslin, Ian Wilmut y Keith Campbell, cuando la transferencia nuclear y la pluripotencia de los núcleos de las células adultas se pusieron de manifiesto y fueron verificadas en mamíferos. Esta hazaña tuvo una gran repercusión entre científicos y el gran público, de tal manera que tanto la “clonación” como la “reprogramación celular” fueron motivo de numerosas publicaciones de todo tipo y debates científicos a todos los niveles.

Está claro que el equipo escocés de Wilmut y colaboradores fueron los primeros en demostrar el postulado de Spemann, lanzado muchos años atrás, al utilizar núcleos de células adultas, totalmente diferenciadas, de glándula mamaria. La transferencia nuclear en mamíferos y su uso potencial en medicina regenerativa, combinada con el aislamiento de las primeras células madre pluripotentes embrionarias humanas, promovió un gran interés en la reprogramación y diferenciación celular, aunque tuvo que afrontar conflictos éticos, contrarios a la utilización de embriones humanos y de sus células madre pluripotentes.

En 2006, la publicación sorprendente de Shinya Yamanaka, investigador de la Universidad de Kyoto, volvió a revolucionar las investigaciones en reprogramación celular. En ella, se demostraba de manera sistemática y sencilla que eran cuatro los genes cuya expresión había que reactivar en células adultas diferenciadas, para que adquirieran características de células madre pluripotentes. Estos cuatro genes, *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*, conseguían transformar una célula somática diferenciada en otra muy distinta, prácticamente no distinguible de las células madre pluripotentes embrionarias, con capacidad de desarrollar un nuevo embrión (en ratones) o de volver a diferenciarse en cualquier tejido celular en el laboratorio (en células humanas y de

ratón), sin requerir la intervención de ningún embrión. Con este descubrimiento se echó por tierra la mayoría de los problemas éticos que habían suscitado los anteriores experimentos en medicina regenerativa con embriones humanos.

Por este descubrimiento y por haber dilucidado los mecanismos moleculares de la reprogramación celular, Shinya Yamanaka ha sido galardonado con el Premio Nobel 2012 de Fisiología y Medicina, compartiéndolo con John B. Gurdon, como se ha comentado. Sin embargo, la Academia sueca olvidó incluir en este Premio Nobel 2012 a algún miembro del Instituto Roslin, Ian Wilmut o Keith Campbell, responsables de la obtención de la oveja Dolly. Dicho animal fue una de las noticias científicas más comentadas del siglo XX, y una aportación fundamental en toda la investigación biomédica en medicina regenerativa. La oveja Dolly cambió la percepción social de la ciencia y trasladó el debate del progreso científico en biomedicina a la sociedad. Keith Campbell (1954-2012) murió dos días antes de que se concediera el Premio Nobel de Fisiología y Medicina de 2012.

■ **Transferencia de núcleos de células somáticas**

John Gurdon, con su experimento de sustitución del núcleo haploide de un óvulo de rana por el diploide de una célula diferenciada, fue el primero que utilizó así el método SCNT en dos etapas: la enucleación de un oocito de rana y la subsiguiente transferencia de un núcleo de una célula somática, del mismo animal. La transferencia del núcleo somático al oocito demostró que a pesar del estado diferenciado del núcleo de la célula donadora, la célula reconstituida parecía reprogramar o desdiferenciar el núcleo capacitándolo para funcionar como un cigoto producido naturalmente. Los cigotos así obtenidos se desarrollaron como embriones viables que se incubaron y crecieron como renacuajos. Como todos los renacuajos procedían de células intestinales de la misma rana adulta, tenían el material genético idéntico y eran clones. Sin embargo, los renacuajos clones, obtenidos por Gurdon por transferencia nuclear, no se metamorfosearon como ranas. Cuando se intentó aplicar esta tecnología a otras especies como ratones, el programa de desarrollo no pudo ser reiniciado. Otros grupos continuaron investigando, y en 1986 Prather y su grupo clonaron una vaca a partir de células embrionarias utilizando transferencia nuclear. Aunque este fue un ejemplo de transferencia nuclear de blastómero, esto influyó efectivamente en el nacimiento de la oveja Dolly diez años después, en 1996.

Posteriormente, otros grupos continuaron estas investigaciones y consiguieron clonar ratones, lo cual fue difícil porque los embriones de ratón empiezan a dividirse in-

mediatamente después de que el óvulo es fertilizado, y se pensó que no habría tiempo para que se verificara la reprogramación. La oveja, sin embargo, como su cigoto no se divide hasta pasadas varias horas después de la fertilización, era una especie más fácil de clonar, ya que el retraso natural entre fertilización y división daría tiempo al oocito para reprogramar su núcleo.

Aunque SCNT es un proceso no eficiente, cuya tecnología tiene un rendimiento relativamente bajo, no se puede pasar por alto lo extraordinario que supone que los sistemas biológicos sean manipulables. En la figura 3 (A) se muestra un ejemplo de transferencia de núcleo de célula somática empleando ratones.

A diferencia del huevo fertilizado o las células embrionarias tempranas que son totipotentes o pluripotentes, sin una misión concreta, las células donantes son especialistas. Esto es, se han configurado hasta tal forma, que sus genomas han sido programados para llevar a cabo la función particular para la que habían sido destinadas. Así las células del riñón no transcriben las instrucciones productoras de leche de la glándula mamaria, aunque sigan llevando esos genes. La pregunta entonces es: ¿Cómo reprogramar el compendio total de instrucciones contenidas en el genoma, de tal manera que se realice un desarrollo normal?

Los experimentos SCNT requieren un reemplazo de núcleos en animal completo, por lo que se lanzaba al aire otra pregunta: ¿Habría forma de revertir la diferenciación celular en una célula intacta?

La respuesta se hizo esperar más de cuarenta años. En 2006, Shinya Yamanaka, mediante la introducción de unos cuantos genes, que solo se encuentran activos en células totipotentes, logró revertir la diferenciación en un tipo de células maduras diferenciadas de ratón (fibroblastos), para originar un tipo de células madre pluripotentes, las células iPS, en un proceso que él denominó *reprogramación celular*, y que en comparación con la reprogramación obtenida por Gurdon se puede considerar reprogramación directa. Figura 3 (B).

El descubrimiento de las células iPS ha proporcionado la primera evidencia del mecanismo interno capaz de reprogramar el estado de una célula diferenciada de un tejido, hacia un estado de célula madre embrionaria, lo que indica la existencia de una fuente intrínseca de juventud en cada célula de nuestro organismo.

¿Cuál es la importancia de todo esto? En primer lugar, este descubrimiento puede tener muchas aplicaciones médicas y biotecnológicas: por ejemplo, obtener células

madre tipo embrionarias sin tener que enfrentarse a los problemas éticos y morales de utilizar células embrionarias. Las células así obtenidas pueden ser utilizadas para experimentos científicos, para diagnóstico y terapia, cultivos celulares *in vitro* o incluso cultivos de órganos. Además, estos descubrimientos han revolucionado el conocimiento científico del desarrollo de los organismos multicelulares, rompiendo con el paradigma de que toda diferencia en una célula u organismo se basa exclusivamente en el material genético, de tal modo que sacude los cimientos de la biología del desarrollo.

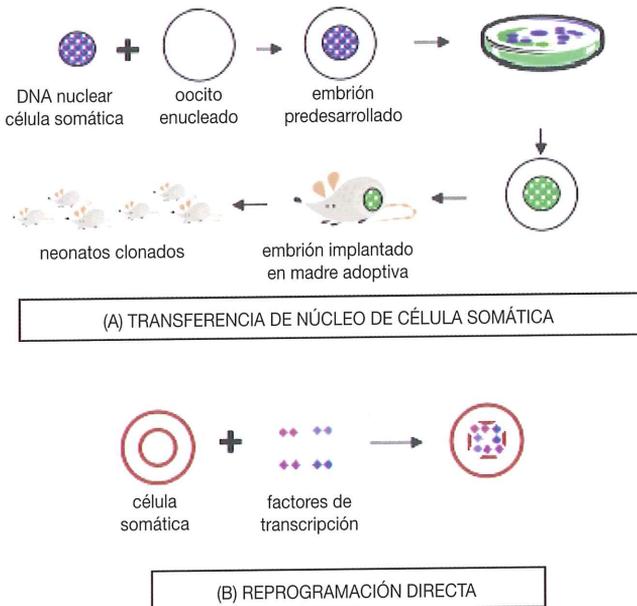
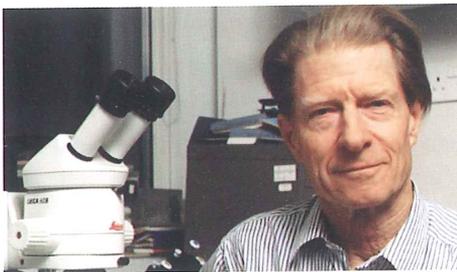
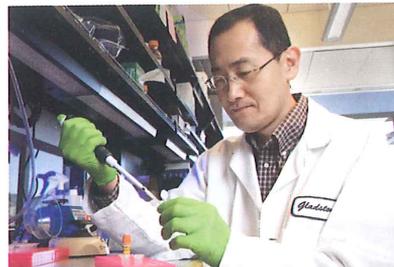


Figura 3. (A): Transferencia del núcleo de una célula somática: El DNA nuclear aislado de una célula somática donante se introduce en un ovocito al que se le ha eliminado el núcleo. De esta unión surge el embrión predesarrollado que se cultiva hasta que se desarrolla totalmente. El embrión desarrollado se implanta en el útero de una hembra adoptiva, resultando en neonatos clonados. **(B):** Reprogramación directa: Una selección de factores de transcripción se introducen en las células somáticas mediante vectores víricos o no víricos para generar células madre pluripotentes (iPS).



John B. Gurdon



Shinya Yamanaka

■ Células madre pluripotentes inducidas (iPS)

El artículo de Takahashi y Yamanaka, publicado en 2006, no tuvo la repercusión social que probablemente le correspondía, al tratarse de experimentos realizados con ratones, y hubo que esperar a 2007, cuando aparecieron resultados similares con células humanas, llevados a cabo de forma independiente por los equipos de Thomson, en EE.UU., y del propio Yamanaka, en Japón, a que la comunidad científica comprendiera la magnitud del descubrimiento al percibir que era posible convertir células somáticas en células madre pluripotentes, mediante un procedimiento de inducción genética y la expresión simultánea de un reducido grupo de genes. Desde entonces, el número de publicaciones que han aparecido en la literatura ha desbordado cualquier previsión, siendo en la actualidad uno de los campos de mayor interés en biología de células madre y en medicina regenerativa.

La expresión de tan solo cuatro factores transcripcionales fue el requisito para transformar una célula somática en una célula iPS. La diferenciación selectiva de células madre se puede conseguir empleando los medios de cultivo oportunos. Los problemas éticos de trabajar con células madre se han esfumado, si se utiliza esta tecnología.

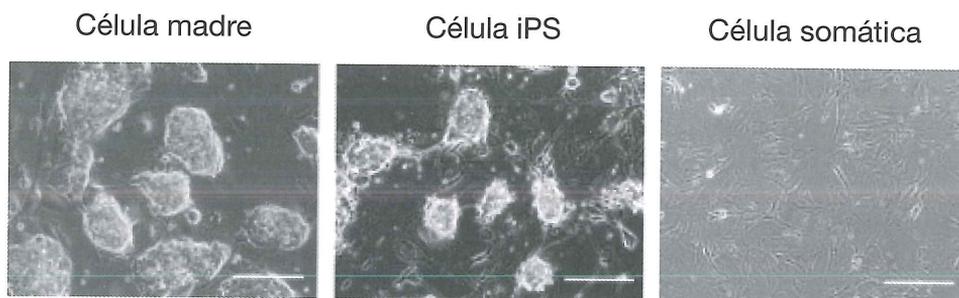


Figura 4. Inducción de células madre pluripotentes en cultivos embrionarios de ratón por factores definidos (Takahashi y Yamanaka, 2006).

Las aplicaciones en medicina de las células madre pluripotentes, capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular del organismo adulto, son numerosas, pues se pueden utilizar para renovar tejidos dañados y con ello paliar múltiples enfermedades como el Parkinson o lesiones de la médula espinal. Yamanaka y su grupo consiguieron por primera vez la desdiferenciación de células somáticas de fibroblastos de ratón en células iPS, por la mera adición de factores externos. El paso fundamental para el descubrimiento de los factores que hacen posible la desdiferenciación celular fue suponer

que los *factores transcripcionales* que mantenían el estado de pluripotente en las células madre eran los mismos que podrían inducir la desdiferenciación de células somáticas. Los investigadores probaron combinaciones de 24 factores transcripcionales, que habían seleccionado previamente como candidatos para reinstaurar la capacidad de pluripotencia en células somáticas, y encontraron que solo cuatro de ellos, los referidos *Oct3/4*, *Klf4*, *Sox2* y *c-Myc*, eran necesarios para revertir la diferenciación celular.

Las células iPS adquieren una morfología similar a las células madre (figura 4), su tasa de duplicación se equipara a estas, y expresan los marcadores celulares típicos de células madre. Otro aspecto analizado en estas células atañe al *epigenoma*. Las islas CpG de los promotores de células madre necesarios para expresar pluripotencia no están metiladas, de forma que la maquinaria de expresión tiene pleno acceso a estas regiones. Sin embargo, las células somáticas tienen patrones de metilación característicos en estas zonas que silencian la transcripción. En las células iPS se ha conseguido borrar estas marcas epigenéticas, de forma que se permita la expresión génica de los factores de transcripción antes silenciados.

La transformación celular se realizó con la ayuda de vectores virales, retrovirus (lentivirus) portadores de las secuencias génicas de los 4 genes.

Gran parte de su éxito fue el ingenioso y elegante sistema de cribado que diseñaron, con unos fibroblastos embrionarios obtenidos de ratones mutantes (*knockout*) para el gen *Fbx15*, de expresión específica en células madre pluripotentes embrionarias, o células ES, en los que este *locus* dirigía la expresión de una región génica de resistencia al antibiótico G418. Al transformar los fibroblastos embrionarios obtenidos de ratones deficientes en *Fbx15* con diversas combinaciones génicas y forzar su crecimiento en presencia del antibiótico, solamente aquellas combinaciones que tuvieron éxito en la conversión de célula somática a célula madre pluripotente permitieron activar el *locus Fbx15* y expresar la resistencia al antibiótico adecuadamente. En este primer trabajo, los autores verificaron algunas de las propiedades de este nuevo tipo celular. Desde el punto de vista morfológico y en relación a marcadores específicos, estas células iPS no se distinguían de las células ES, con la salvedad de que las iPS no provenían de embriones, sino de células somáticas. Se obtuvieron los perfiles de expresión génica característicos de estas células iPS y se pudo observar que eran más parecidos, aunque no idénticos, a los de las células ES, y totalmente distintos de los de las células somáticas de donde provenían. Además, confirmaron que, una vez inyectadas subcutáneamente en ratones inmunodeficientes, eran capaces de originar teratomas con células de los tres estratos germinales, y más aún,

contribuían al desarrollo embrionario al ser inyectadas en blastocistos. Sin embargo, en este primer trabajo no se pudieron obtener quimeras ni transmisión del genotipo iPS a través de la línea germinal.

De forma independiente, aproximadamente un año más tarde, el grupo de Jaenisch logró reproducir los resultados de Takahashi y Yamanaka y consiguió culminar la transmisión por vía germinal del genotipo de estas nuevas células iPS. A partir de la transformación de fibroblastos embrionarios de ratón con los mismos 4 genes ya mencionados, usó con éxito las células iPS generadas, microinyectándolas en blastocistos de ratón, y obtuvo quimeras, que transmitieron el genotipo a la descendencia. Adicionalmente, aportó nuevas pruebas moleculares que indicaban que el estado de reprogramación y epigenético conseguido en las células iPS las hacía del todo no distinguibles de las células ES. Este trabajo coincidió con un segundo trabajo del equipo de Yamanaka en el que demostraba igualmente que las células iPS eran capaces de contribuir y transferir su genotipo a través de la línea germinal, si se seleccionaban aquellas células iPS con mayores niveles de expresión del gen *Nanog*, específico de células ES. De las quimeras generadas también se observó la aparición de tumores en los ratones, probablemente derivados de la activación ectópica y anómala de *c-Myc*, con lo que ya apuntaron estos autores que, en el futuro, cualquier aplicación clínica que pretendiera usar células iPS debería evitar el gen *c-Myc*, por su capacidad tumorigénica.

Nuevamente, el grupo de Jaenisch demostró que basándose únicamente en criterios morfológicos para evaluar el grado de conversión de las células somáticas a células madre, sin mediar modificación genética previa alguna que ayudara a describir y aislar las células iPS (p.e. usando el *locus Fbx15*, o el *locus Oct3/4* o el *locus Nanog*, todos ellos con fuerte expresión específica en células ES), era posible obtener células iPS, reprogramadas a partir de fibroblastos de ratón. El procedimiento funcionaba y era reproducible en muchos laboratorios, por lo que un año después de su primera descripción, ya se publicaba el protocolo que permitía obtener estas células iPS mediante transducción genética de un reducido número de genes, naturalmente preparado por el grupo de Yamanaka. El mismo grupo se encargó de demostrar que, partiendo de células somáticas y diferenciadas del estómago o del intestino, era posible derivar células madre pluripotentes inducidas. De hecho, a raíz de ser posible obtener múltiples líneas de iPS de los más diversos tipos celulares, y de constatar en muchos experimentos independientes la eficacia del proceso, se concluyó que la explicación del mecanismo tenía que ver fundamentalmente con los genes transferidos, y no con los sitios de integración de los vectores virales utilizados.

Posteriormente se ha demostrado que el protocolo general puede requerir alguna pequeña modificación para ser aplicado en la reprogramación de determinados tipos celulares somáticos. En este sentido, Jaenisch demostró que para la obtención de células iPS a partir de linfocitos B maduros no solo era necesario la adición de los cuatro genes mencionados sino la inclusión de un quinto gen, *c/Ebp α* , y la supresión o inactivación de uno adicional, *Pax5*. También se ha podido demostrar en ratones que, en determinados tipos celulares (como las células madre adultas neurales), con elevados niveles de expresión endógena de los genes *c-Myc* y *Sox2*, basta con transformar solamente dos genes (*Oct3/4* y *Klf4*) para obtener células iPS. Este experimento indica que para que la reprogramación e inducción del fenotipo pluripotente sea correcta y completa, no es necesaria la transducción de los cuatro genes, sino que puede complementarse el proceso con la expresión endógena normal de alguno de ellos en algún tipo celular. El mismo equipo, dirigido por Shöler, ha llevado el experimento al límite, demostrando que, en esencia, solamente hace falta un gen, el gen *Oct3/4*, para convertir a una célula madre neural adulta en célula pluripotente inducida, siendo dispensables, en este contexto y en estas condiciones, los otros tres que, de hecho, ya se expresan de forma natural en dichas células madre adultas del sistema nervioso. Esta plasticidad de las células somáticas, que pueden ser reprogramadas a pluripotentes a través de la expresión de una serie de genes que codifican para factores de transcripción, ha abierto un camino nuevo gobernado por un reducido número de genes, cuya expresión está interrelacionada, de ahí que diferentes combinaciones, en apariencia distintas, logren el mismo efecto. Tal grado de interrelación se comprueba igualmente al haberse demostrado que puede mimetizarse la reprogramación mediada por alguno de estos cuatro factores mediante fármacos inhibidores de quinasas y agentes bloqueantes de pasos clave en las cascadas de señalización, que la célula somática puede interpretar reactivando la pluripotencia y manifestando el fenotipo de célula madre pluripotente inducida.

La medicina regenerativa con células madre pluripotentes/multipotentes promete ser un medio terapéutico para el tratamiento de anomalías del desarrollo, enfermedades degenerativas y achaques relacionados con la edad. Sin embargo, el suministro y la inocuidad de las células madre son dos problemas importantes a resolver hoy en la medicina regenerativa. El reciente descubrimiento de las células iPS va a permitir suministrar a los pacientes células madre embrionarias propias. Todavía la tumorigénesis potencial de las células iPS permanece como obstáculo. Durante la embriogénesis temprana las células ES se generan sin formación de tumores, por tanto el profundizar en el conocimiento de estas células puede ayudar a prevenir la tumorigénesis de las células iPS.

■ **Potencial terapéutico y medicina regenerativa**

Los experimentos de Takahashi y Yamanaka en 2006 se han convertido, sin ningún género de duda, en una de las contribuciones más importantes de la biología de las células madre. En 2007, estos experimentos se demostraron en células humanas por Thompson en EE.UU. y por Yamanaka en Japón, y fue entonces cuando la comunidad científica y la sociedad se dieron cuenta del alcance de estos descubrimientos, y desde entonces el número de publicaciones que han aparecido en la literatura científica ha desbordado cualquier previsión, siendo hoy uno de los campos de mayor interés en la biología de las células madre y en terapia regenerativa.

Este estudio abre un gran campo de posibilidades para generar células pluripotentes específicas de un paciente. Incluso en casos de integración retroviral, las células iPS humanas son extraordinariamente útiles para el estudio de mecanismos de enfermedades, dosificación de fármacos y toxicología. Por ejemplo, células iPS derivadas de hepatocitos de pacientes con diversas enfermedades pueden ser estudiadas para predecir la toxicidad de fármacos candidatos. Una vez que se consiga mayor eficiencia e inocuidad en las células iPS, estas serán aplicables en medicina regenerativa.

Las células iPS no son idénticas a las células madre embrionarias humanas. Análisis mediante microchips de DNA han detectado diferencias entre las dos líneas de células madre pluripotentes. Se necesitan más estudios para determinar si las iPS humanas pueden reemplazar a las células madre embrionarias naturales en aplicaciones médicas.

La medicina regenerativa utilizando células iPS supone una gran promesa para el desarrollo de terapias selectivas para el tratamiento de anomalías del desarrollo, enfermedades degenerativas y achaques del envejecimiento. Sin embargo, el suministro y la inocuidad de las células madre son dos problemas importantes a resolver hoy en la medicina regenerativa. La obtención de células iPS va a permitir suministrar a los pacientes células madre embrionarias propias. Sin embargo, la tumorigénesis potencial de las células iPS permanece aún como un obstáculo. Durante la embriogénesis temprana, las células ES se generan sin formación de tumores, por tanto el profundizar en el conocimiento de estas células puede ayudar a prevenir la tumorigénesis de las células iPS.

El potencial terapéutico de estas células iPS es enorme en cualquier caso. Si realmente no se distinguen de las células pluripotentes embrionarias, y se comportan

como ellas dando lugar, mediante diferenciación celular, a cualquier tipo celular existente en el cuerpo, pueden ser la fuente celular inagotable que necesita la medicina regenerativa, sin mediar ni requerir el uso de embriones. Un esquema terapéutico simple podría ser el siguiente: una persona que padezca una patología congénita o degenerativa, que afecta a un determinado tipo celular, puede donar cualquiera de sus células adultas sanas para, mediante de inducción genética, obtener células iPS, a partir de las cuales derivar, mediante diferenciación, el tipo de células dañadas o en degeneración que se quisiera substituir o reparar.

El procedimiento, así explicado, parece sencillo, no requiere del uso de embriones y mantiene la identidad genética de las células, por lo que no se esperarían los problemas de rechazo que suscitaban el uso de las células madre embrionarias, para lo cual Jaenisch diseñó el procedimiento de la clonación terapéutica y fue el mismo quien, cinco años más tarde, en el campo de las células iPS, puso a punto un procedimiento que sirvió para confirmar el potencial terapéutico de estas células madre pluripotentes inducidas en ratones.

En este trabajo, partiendo de un modelo experimental en ratones con anemia falciforme, se obtuvieron células iPS que se modificaron genéticamente para corregir el defecto genético asociado al gen de las b globinas (causante de la anemia falciforme), se seleccionaron y amplificaron las células iPS así modificadas, se diferenciaron estas células a células progenitoras de la sangre y, tras eliminar las células de la médula ósea del ratón, se le introdujeron las nuevas, que reconstituyeron todo el sistema inmune, y en particular dieron lugar a los nuevos eritrocitos sin anemia falciforme, curando la patología del animal. En humanos, todavía no se ha logrado un experimento terapéutico parecido, pero los resultados preliminares que van apareciendo apuntan a que no tardará en producirse. Por ejemplo, el mismo equipo de Thomson ha demostrado que es posible obtener cardiomiocitos funcionales a partir de células iPS obtenidas de células somáticas humanas, por lo que su potencial aplicación para procedimientos de medicina regenerativa y uso de implantes celulares autólogos está ciertamente a la vuelta de la esquina.

Otro de los campos activos de investigación en células pluripotentes está siendo la exploración sobre si son necesarias las modificaciones genéticas, permanentes o transitorias, que permiten la reprogramación celular. Algunos estudios apuntan a que determinados tipos celulares (como las células madre de testículo o espermatogonias), fuera de su contexto, cultivados en el laboratorio en medios de cultivo específicos,

pueden comportarse como células pluripotentes sin necesidad de modificación genética alguna.

El uso de estrategias de reactivación de los cuatro genes relevantes para la programación celular que eviten el uso de vectores virales, por su potencial peligro mutagénico, es en células humanas, fuente constante de nuevas iniciativas y descubrimientos. Además del uso de vectores adenovirales o de la transfección repetida de plásmidos, han aparecido estrategias que permiten eliminar los virus portadores de los cuatro genes, una vez integrados y una vez cumplida su función reprogramadora, mediante una sencilla recombinación y escisión mediada por una recombinasa. También se ha logrado obtener células iPS a partir de fibroblastos de pacientes afectados por la enfermedad de Parkinson y otras enfermedades a fin de obtener modelos útiles que permitan avanzar en el conocimiento de patologías diversas. Otra estrategia involucra el uso de transgenes inducibles, bien de expresión directa o controlada por doxiciclina, que expresan los factores de reprogramación y que pueden ser eliminados, tras ser escindidos, mediante transposición, utilizando las herramientas del sistema del trasposon *piggyBac*.

■ Conclusiones

La generación de las células iPS hace ya seis años ha proporcionado a los científicos una plataforma única para diseccionar los mecanismos involucrados en la reprogramación celular. Aunque es mucho lo que queda aún por resolver, lo cierto es que hoy se tienen importantes conocimientos sobre el proceso de reprogramación, tales como que las células sufren cambios moleculares definidos y secuenciales de una manera aparentemente estocástica, y que esos cambios están influenciados por la selección y número de factores de transcripción, así como por el tipo de células de partida.

El descubrimiento de las células iPS ha influenciado también nuestro conocimiento del desarrollo normal, al demostrar que la activación de unos pocos factores de transcripción puede cambiar el destino celular, de ahí que las células de mamíferos hayan desarrollado mecanismos epigenéticos para bloquear las células una vez que se han diferenciado. Estos mecanismos se rompen a menudo en las células cancerosas, las cuales muestran características de células madre y signos de desdiferenciación. Curiosamente, muchas vías señalizadoras mutadas en células cancerosas se ha demostrado que afectan la formación de las células iPS, lo que indica la existencia de notable similitud entre la tumorigenesis y la reprogramación celular.

El aislamiento de las células iPS ha promovido un nuevo interés en la interconversión directa de tipos celulares maduros entre sí, la transdiferenciación, de lo cual ya se conoce la existencia de destacados ejemplos para tipos celulares pancreáticos, musculares y neurales. Es probable que muchos otros cambios celulares se consigan en un próximo futuro.

A pesar de lo mucho que se ha avanzado en la tecnología de la obtención de las células iPS humanas, se sabe aún poco sobre su equivalencia molecular y funcional con las células madre embrionarias, lo cual puede afectar su potencial utilidad terapéutica. Se requiere no solo analizar la integridad genómica y epigenómica de las iPS humanas, sino también conseguir protocolos óptimos para evaluar la funcionalidad de las células especializadas derivadas de las iPS.

Aunque el potencial terapéutico de las células madre pluripotentes inducidas es enorme, en un futuro próximo se conocerá la realidad de ese potencial. Todavía quedan muchos interrogantes por contestar, a pesar de que en plazos muy cortos de tiempo se han solventado barreras que parecían insalvables hace muy poco (evitar el uso de *c-Myc*, evitar el uso de vectores retrovirales, evitar la modificación genética mediante la inducción de la reprogramación utilizando procedimientos químicos, restringir la fase de pluripotencia a la estrictamente necesaria, para luego pasar a diferenciar estas células al tejido *destino* que se pretenda substituir o reparar, etc.). En pocos años, el campo de las células iPS ha producido multitud de publicaciones, muchas de ellas pioneras, innovadoras, otras tantas de tipo descriptivo o confirmando observaciones realizadas anteriormente, pero incluso estas últimas son de extraordinaria relevancia, pues dan la idea acertada de lo sorprendente del descubrimiento de Takahashi y Yamanaka, y también de su alto grado de reproducibilidad. De la relevancia de todos estos estudios es de esperar que pronto puedan derivarse realidades terapéuticas que compensen las enormes esperanzas que estas investigaciones han suscitado entre pacientes afectados por enfermedades incurables o degenerativas.

■ Abreviaturas

cMyc, gen tumorigénico que codifica para el factor de transcripción *Myc*.

ES (células), células madre embrionarias.

iPS (células), células madre pluripotentes inducidas.

Klf4, gen que codifica para el factor de transcripción *Klf4*.

MEF, fibroblastos embrionarios de ratón.

Oct3/4, gen que codifica para el factor de transcripción Oct3/4.

Sox2, gen que codifica para el factor de transcripción Sox2.

SCNT, transferencia de núcleo de célula somática.

■ Bibliografía consultada

Aasen T., Raya A, Barrero M.J., Garreta E., Consiglio A., Gonzalez F., Vassena R., Bilić J., Pekarik V., Tiscornia G., Edel M., Boué S., Izpisua Belmonte J.C. (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol.*26, 1276-1284.

Aoi T., Yae K., Nakagawa M., Ichisaka T., Okita K., Takahashi K., Chiba T., Yamanaka S. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321, 699-702.

Briggs, R., King, T.J. (1952) Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *PNAS. USA* 38, 455-463.

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

Gurdon J.B. (1962). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol* 4, 256-273.

Gurdon J.B., Uehlinger V. (1966). "Fertile" intestine nuclei. *Nature* 210, 1240-1241.

Hajkova P. (2011). Epigenetic reprogramming in the germ line: towards the ground state of the epigenoma. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366, 2266-2273.

Hanna J., Wernig M., Markoulaki S., Sun C.W., Meissner A., Cassady J.P., Beard C., Brambrink T., Wu L.C., Townes T.M., Jaenisch R. (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318, 1920-1923

Hanna J., Markoulaki S., Schorderet P., Carey B.W., Beard C., Wernig M., Creyghton M.P., Steine E.J., Cassady J.P., Foreman R., Lengner C.J., Dausman J.A., Jaenisch

- R. (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133, 250-264.
- Hochedlinger, K. (2010). Your Inner Healers: A Look into the Potential of Induced Pluripotent Stem Cells. *Scientific American* 302, 46-53, a Division of Nature America.
- Huangfu D., Osafune K., Maehr R., Guo W., Eijkelenboom A., Chen S., Muhlestein W., Melton D.A. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol.* 26, 1269-1275.
- Kaji K., Norrby K., Paca A., Mileikovsky M., Mohseni P., Woltjen K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771-775.
- Kim J.B., Zaehres H., Wu G., Gentile L., Ko K., Sebastiano V., Araúzo-Bravo M.J., Ruau D., Han D.W., Zenke M., Schöler H.R. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 454, 646-650.
- Kim J.B., Sebastiano V., Wu G., Araúzo-Bravo M.J., Sasse P., Gentile L., Ko K., Ruau D., Ehrich M., van den Boom D., Meyer J., Hübner K., Bernemann C., Ortmeier C., Zenke M., Fleischmann B.K., Zaehres H., Schöler H.R. (2009). Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* 136, 411-419.
- Lacadena J.R. (2013.) Premio Nobel de Medicina 2012. *Anales de la Real Academia de Farmacia* 79, 151-171.
- Lewitzky M., Yamanaka S. (2007). Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. *Curr Opin Biotechnol* 18, 467-473.
- Lin S.L. (2011). Concise review: Deciphering the mechanism behind induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells* 29, 1645-1649.
- Loh Y.H., Agarwal S., Park I.H., Urbach A., Huo H., Heffner G.C., Kim K., Miller J.D., Ng K., Daley G.Q. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113, 5476-5479.
- Meissner A., Wernig M., Jaenisch R. (2007). Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 25, 1177-1181.

- Montoliú L. (2009). Células pluripotentes inducidas. En Células madre y terapia regenerativa (Ed. Flora de Pablo Dávila y María Cascales Angosto). Real Academia Nnal de Farmacia, pp. 83-100. Madrid.
- Montoliú L. (2012). El Nobel premia la reprogramación. SEBBM Divulgación y Ciencia para todos.
- Okita K., Ichisaka T., Yamanaka S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.
- Okita K., Yamanaka S. (2011). Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366, 2198-2207.
- Park I.H., Zhao R., West J.A., Yabuuchi A., Huo H., Ince T.A., Lerou P.H., Lensch M.W., Daley G.Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141-146.
- Patel M., Yang S. (2010). Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev* 6, 367-380 .
- Rideout W.M. 3rd, Hochedlinger K., Kyba M., Daley G.Q., Jaenisch R. (2002). Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 109, 17-27.
- Scadden, D.T. (2004). Cancer stem cells refined. *Nat. Immunol.* 5, 701-703.
- Silva J., Barrandon O., Nichols J., Kawaguchi J., Theunissen T.W., Smith A. (2008). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol.* 6, e253.
- Soldner F., Hockemeyer D., Beard C., Gao Q., Bell G.W., Cook E.G., Hargus G., Blak A., Cooper O., Mitalipova M., Isacson O., Jaenisch R. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136, 964-977.
- Spemann, H. (1938). *Embryonic Development and Induction* (Yale University Press, New Haven).

- Stadtfield M., Hochdinger K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms and applications. *Genes Develop* 24, 2239-2263.
- Takahashi K., Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors, *Cell* 131, 861-872.
- Takahashi K., Okita K., Nakagawa M., Yamanaka S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc.* 2, 3081-3089.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Watanabe A., Yamada Y., Yamanaka S. (2013). Epigenetic regulation in pluripotent stem cells: a key to break the epigenetic barrier. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 368 (1609).
- Welstead G.G., Schorderet P., Boyer L.A. (2008). The reprogramming language of pluripotency. *Curr Opin Genet Dev.*18, 123-129.
- Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell K.H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385, 810-813.
- Wilmut I., Sullivan G., Chambers I. (2011). The evolving biology of cell reprogramming *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366, 2183-2197.
- Woltjen K., Michael I.P., Mohseni P., Desai R., Mileikovsky M., Hämmäläinen R., Cowling R., Wang W., Liu P., Gertsenstein M., Kaji K., Sung H.K., Nagy A. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766-770.
- Yamanaka S. (2008). Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 363, 2079-2087.

Yamanaka S. (2009). Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 460, 49-52.

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

Yamanaka S. (2012). Induced pluripotent stem cells: past, present and future. *Cell Stem Cell* 10, 678-684.

Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R., Slukvin I.I., Thomson J.A. (2007). Induced pluripotent stem cells lines derived from human somatic cells *Science* 318, 1917 – 1920.

Zhang J., Wilson G.F., Soerens A.G., Koonce C.H., Yu J., Palecek S.P., Thomson J.A., Kamp T.J. (2009). Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells *Circ Res* 104, e30-41.

www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2012/press.html#

www.cnb.csic.es/trasimp/stem/html. Luis Montoliu Recopilación de WEB