

3. Células pluripotentes inducidas

LLUÍS MONTOLIU

RESUMEN

Las células troncales pluripotentes inducidas ó iPS (del inglés, *induced Pluripotent Stem cells*) han revolucionado la biología de las células troncales y sus posibles aplicaciones terapéuticas en medicina regenerativa. Los experimentos pioneros de Takahashi y Yamanaka, realizados inicialmente con células de ratón, en 2006, y posteriormente refrendados, un año más tarde, por el mismo laboratorio y otros, de forma independiente, en células humanas, describieron una tercera vía para obtener células troncales pluripotentes. Hasta ese momento conocíamos esencialmente dos alternativas para obtener células troncales pluripotentes, obtenidas bien fuera a partir de embriones (blastocistos), las denominadas células troncales pluripotentes «embrionarias», bien fuera a partir de células somáticas, presentes en tejidos de fetos, recién nacidos o adultos, las denominadas células troncales pluripotentes «adultas». Los investigadores japoneses demostraron que la adición de un reducido número de genes posibilitaba la transformación, la inducción de células somáticas a células troncales pluripotentes. Por ello, a las células troncales obtenidas por este tercer procedimiento se las denominó pluripotentes «inducidas» o iPS. En este capítulo resumiré las investigaciones publicadas en los tres últimos años en este campo, subrayando los descubrimientos, las innovaciones científicas y tecnológicas y las continuas variaciones metodológicas que se suceden en la literatura a la búsqueda de técnicas de obtención y uso de células pluripotentes inducidas cada vez más eficaces y robustas. Finalmente, es importante resaltar la credibilidad y relevancia de estos trabajos, validados y refrendados por múltiples laboratorios de for-

ma independiente en todo el mundo, frente a los recientes casos de fraude que habían contaminado lamentablemente el campo de investigación de las células troncales pluripotentes humanas.

ABSTRACT

The induced pluripotent stem cells (iPS) have triggered a revolution in the field of the biology of stem cells and their putative therapeutical applications in regenerative medicine. The pioneer experiments of Takahashi and Yamanaka, initially carried out with mouse cells in 2006, and confirmed one year later by the same laboratory and others, independently, with human cells, described a third method to obtain pluripotent stem cells. Up to then, we knew essentially two alternative methods to derive pluripotent stem cells, obtained either from embryos (blastocysts), for the cells called pluripotent embryonic stem cells (ES), or obtained from somatic cells, found in fetal, newborn or adult tissues, for the cells called pluripotent adult stem cells. The Japanese researchers demonstrated that adding a limited number of genes triggered the transformation, the induction of pluripotent stem cells from somatic cells. Therefore, these stem cells obtained following this third method are called induced pluripotent stem cells, or iPS.

In this chapter, I will summarise the reported experiments published in the last three years in the field, highlighting the challenges, the scientific and technological innovations and the several continuous methodological variations that are appearing in the literature, searching for techniques to derive and use induced pluripotent stems cells robustly and more efficiently. Finally, it is important to remark the credibility and relevance of all these works, validated and confirmed by multiple laboratories independently world wide, in contrast to the recent cases of fraud that have regrettably contaminated the research field of human pluripotent stem cells.

INTRODUCCIÓN

Nada hacía presagiar que el año 2006, que había empezado con la peor de las noticias, el descubrimiento del descomunal fraude de Woo Suk Hwang, acabaría pasando a la historia por un hecho mucho más

importante y esperanzador, la primera descripción de las células troncales pluripotentes inducidas, publicada en la revista *Cell*, en Agosto de 2006, en un artículo original cuyos autores eran Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka (1).

En efecto, en los dos años anteriores, 2004 y 2005, los científicos y la sociedad en general se había quedado prendada de los sorprendentes avances supuestamente llevados a cabo por el científico surcoreano y su equipo, con el aislamiento de las primeras células troncales embrionarias humanas obtenidas por transferencia nuclear, en 2004, y por el todavía más espectacular incremento de la eficiencia del proceso y la extensión a la obtención de estas células a partir de pacientes con diferentes enfermedades, publicado en 2005. Nada era cierto. Todo fue un fraude, que acabo provocando la retirada de las publicaciones mencionadas y un histórico editorial en *Science*, la revista que publicó los artículos de Woo Suk Hwang, publicado a finales de Enero de 2006, en el que se admitía que una parte importante de los datos presentes en ambas publicaciones habían sido fabricados (2).

Sin embargo, mientras que la mayoría de los científicos estaban lamentándose del suceso e intentando reparar, en lo posible, el enorme daño que esta revelación de conducta inapropiada había causado a la profesión, y a la sociedad en general, en el laboratorio de Shinya Yamanaka, de la Universidad de Kyoto, en Japón, se estaban ultimando unos experimentos y se estaba preparando una publicación científica que, sin ningún género de dudas, está llamada a convertirse en una de las contribuciones más importantes, fundamentales, de la biología de las células troncales. En esencia, estos dos investigadores japoneses habían estudiado, de forma pormenorizada, la combinación mínima de genes necesaria para transformar una célula somática cualquiera, por ejemplo un fibroblasto, en una célula troncal, indistinguible de las células pluripotentes troncales embrionarias (1). Su hipótesis experimental era que debía existir un reducido número de funciones génicas que, al reactivarlas, fueran capaces de reprogramar cualquier célula y retornarla, transformarla en célula pluripotente.

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 finales del

año siguiente, en noviembre de 2007, cuando aparecieron publicados resultados similares con células humanas, llevados a cabo de forma independiente por los equipos de Thomson (3), en EEUU, y del propio Yamanaka (4), en Japón. Fue entonces cuando la comunidad científica en su conjunto, y la sociedad en general conocieron que era posible convertir células somáticas en células troncales pluripotentes, mediante un procedimiento de inducción genética, mediante la expresión simultánea de un reducido grupo de genes. Estas células se denominaron *iPS cells* (del inglés, *induced pluripotent stem cells*) y, desde entonces, el número de publicaciones que han aparecido en la literatura ha desbordado cualquier previsión, siendo en la actualidad el estudio de las células iPS uno de los campos de mayor interés en biología de células troncales y en medicina regenerativa.

La traslación social de este descubrimiento había seguido un proceso similar, aunque afortunadamente más rápido, que el aislamiento de las primeras células troncales embrionarias pluripotentes de ratón, células ES (Figura 1), llevado a cabo en 1981, de forma independiente, por

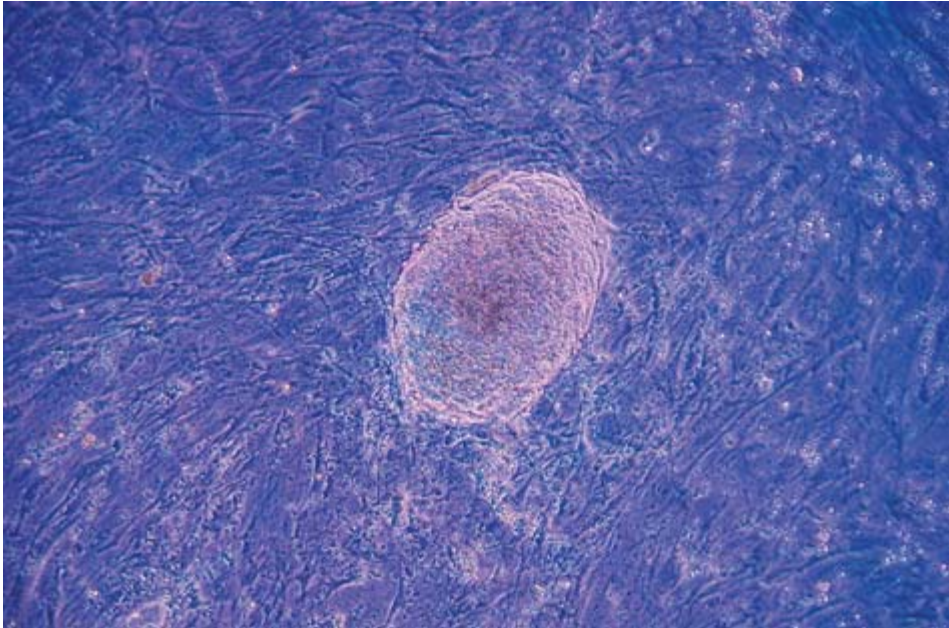


FIGURA 1. **Células troncales pluripotentes embrionarias de ratón (ES)**. Microfotografía al microscopio óptico de contraste de fases en la que se observa un grupo de células ES de ratón creciendo sobre un césped de fibroblastos murinos embrionarios.

dos laboratorios: Martin Evans (5) en el Reino Unido, y Gail Martin (6) en EEUU. Sin embargo el conocimiento social de la existencia de células troncales pluripotentes embrionarias no se diseminó socialmente ni permeó a otras disciplinas científicas más clínicas hasta que, 17 años más tarde, en 1998, dos equipos norteamericanos liderados por Thomson y Gearhart, también de forma independiente, publicaran sus primeros resultados con la descripción de las primeras células troncales pluripotentes embrionarias humanas obtenidas a partir de blastocistos (7) o de primordios germinales fetales (8).

Desde 2007 hasta la actualidad no hay mes, semana en la que no se publiquen avances relevantes en el campo de las iPS. Los primeros genes utilizados para la inducción de la pluripotencia han ido reduciéndose paulatinamente, de la misma manera que los protocolos de inducción han sido cada vez más imaginativos, evitando la utilización de vectores virales de integración en el genoma. Cada vez son más los tipos celulares somáticos de los que es posible y está documentado obtener células iPS, con procedimientos similares, aunque a veces no idénticos.

En las páginas siguientes describiré la reciente revolución metodológica que ha permitido obtener las células iPS y los experimentos más relevantes publicados hasta el momento.

CÉLULAS INDUCIBLES PLURIPOTENTES (iPS) DE RATÓN

Los resultados publicados por Takahashi y Yamanaka (1) revolucionaron la investigación en células troncales. A través de un análisis sistemático de un grupo inicial de 24 genes, cuya expresión se había asociado de forma específica a células troncales embrionarias (ES), y mediante experimentos de transfección en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), en los que se iba eliminando, uno a uno, solamente uno de los 24 en cada experimento, llegaron a reducir la lista de genes primero a 10, y finalmente a solo 4, los cuatro genes *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*, que permitían inducir células con características de células troncales pluripotentes a partir de células somáticas. La transformación celular se hacía a través de vectores virales, retrovirus (lentivirus) portadores, de forma individual o combinada, 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 MEF obtenidos de ratones mutantes (*knock-out*) para el gen *Fbx15*, dispensable pero de expresión específica en células ES, en los que este locus dirigía la expresión de un *cassette* de resistencia al antibiótico G418. Al transformar los MEF obtenidos de ratones deficientes en *Fbx15* con diversas combinaciones génicas y forzar su crecimiento en presencia del antibiótico, solamente aquellas combinaciones exitosas en la conversión de célula somática a célula troncal pluripotente (similar a ES) permitían activar el locus *Fbx15* y expresar la resistencia al antibiótico adecuadamente. En este primer trabajo, en el que se acuñó el término de células iPS, los autores también verificaron algunas de las propiedades de este nuevo tipo celular. Desde el punto de vista morfológico y en relación a marcadores específicos, estas células creadas, iPS, eran del todo indistinguibles de las células troncales pluripotentes embrionarias (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 distintos de los de las células somáticas MEF, de donde provenían. Adicionalmente, confirmaron que eran capaces de derivar teratomas con células de las tres hojas embrionarias (mesodermo, ectodermo y endodermo) tras inyectarlas subcutáneamente en ratones inmunodeficientes, y más todavía, 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 Rudolf Jaenisch del MIT, no solamente logró reproducir los resultados de Takahashi y Yamanaka sino que consiguió culminar con éxito la transmisión por vía germinal del genotipo de estas nuevas células iPS. A partir de la transformación de MEF con los mismos 4 genes mencionados (*Oct3/4*, *Sox2*, *Kfl4* y *c-Myc*), usó con éxito las células iPS generadas para microinyectarlas 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 indistinguibles de las células ES (9). Este trabajo coincidió con un segundo trabajo del equipo de Yamanaka en el que demostraba igual-

mente 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 (10). De las quimeras generadas también se observó, por vez primera, la aparición de tumores en los ratones generados, 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 usar el gen *c-Myc*, por su capacidad tumorigénica (10).

Seguidamente, nuevamente el grupo de Jaenisch, demostró, por vez primera, que basándose únicamente en criterios morfológicos para evaluar el grado de conversión de las células somáticas a troncales, 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 (11).

El procedimiento era sorprendente pero funcionaba, y era reproducible en muchos laboratorios. Por ello, apenas un año después de su primera descripción, ya se publicaba la receta completa, el protocolo genérico que permitía obtener estas células iPS mediante transducción genética de un reducido número de genes, naturalmente preparado por el grupo de Yamanaka (12). El mismo grupo se encargó de demostrar que también de células del estómago o del intestino, somáticas y diferenciadas, es posible derivar células troncales pluripotentes inducidas (13). De hecho, a raíz de ser posible obtener múltiples líneas de iPS de los más diversos tipos celulares, y de constatarse 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 (13).

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, el grupo de 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* (14). También se ha podido demostrar en ratones que, en determinados tipos celulares (como las células troncales adultas neurales), con elevados niveles de expresión endógena de los genes *c-Myc* y *Sox2*, basta con transformar con 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 (15). 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 troncal 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 troncales adultas del sistema nervioso) (16).

Esta sorprendente plasticidad, inesperada, 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, un lenguaje nuevo, el lenguaje de la reprogramación que, en contraste de lo que pudiera haberse supuesto, está gobernada, esencialmente, por un reducido número de genes, cuya expresión, además, está interrelacionada, de ahí que diferentes combinaciones, en apariencia distintas, logren el mismo efecto (17). Tal grado de interrelación se comprueba igualmente al haberse demostrado que puede mimetizarse la reprogramación mediada por alguno de estos cuatro factores mediante compuestos, mediante drogas, como inhibidores de quinasas, bloqueadores de pasos clave en las cascadas de señales de transducción que la célula somática puede interpretar de forma similar, reactivando la pluripotencia y manifestando el fenotipo de célula troncal pluripotente inducida (18).

La inclusión del gen *c-Myc* en el grupo de cuatro genes destinados a inducir pluripotencia es problemática. *c-Myc* es un protooncogen implicado en muchas funciones celulares, incluyendo el control del ciclo celular. La activación anómala y/o fuera de control puede causar tumores por lo que la re-introducción sistemática de *c-Myc* era peligrosa. Por

ello, el grupo de Yamanaka decidió explorar si era posible obtener células iPS con la inducción genética provocada por *Klf4*, *Oct3/4* y *Sox2*, pero sin añadir *c-Myc*. Lograron células iPS igual de robustas que las anteriores (con *c-Myc*) pero con una menor eficiencia, y, lo que era mucho más importante, ninguno de los ratones derivados a partir de esas células iPS desarrolló tumores (19).

La utilización de vectores retrovirales, lentivirales, tampoco está exenta de problemas. Los lentivirus (y retrovirus en general) son integrativos y, por lo tanto, pueden causar mutagénesis por inserción en el genoma, dado que el proceso es al azar. Es obvio que para trasladar a la práctica clínica los protocolos de transferencia genética, en humanos, estos no deberían incluir posibles modificaciones genéticas causadas por la inserción de lentivirus. En este sentido, se han publicado los primeros trabajos documentando el uso de vectores adenovirales, y por lo tanto episomales, no integrativos, como vehículo para la transformación (la transducción) de las células somáticas en células iPS (20). El propio Yamanaka ha llevado este argumento más allá, proponiendo y demostrando que es posible transformar repetidamente las células somáticas, fibroblastos, con plásmidos portadores de los cuatro genes y conseguir (a pesar de la extinción y no integración de los plásmidos, pero debido a la expresión transitoria conseguida de los cuatro genes) derivar células iPS (21).

CÉLULAS INDUCIBLES PLURIPOTENTES (iPS) HUMANAS

Tal y como se ha adelantado en la introducción, el conocimiento universal de la existencia de células iPS no tuvo lugar hasta finales del año 2007, cuando dos equipos, de forma independiente, de nuevo Yamanaka y de nuevo Thomson (el mismo que en 1998 había obtenido las primeras células troncales embrionarias humanas) consiguieron obtener las primeras células troncales pluripotentes inducidas (iPS) a partir de fibroblastos humanos. El laboratorio de Thomson optó por transformar los fibroblastos humanos con cuatro genes, de los cuales dos eran distintos al grupo de genes usados anteriormente por el equipo japonés y también de expresión específica en las células ES. En concreto, usaron los genes *OCT4* (también llamado *OCT3/4*), *SOX2*, *NANOG* y *LIN28* para obtener las primeras células iPS humanas (22). Estas células iPS así

obtenidas las inyectaron intramuscularmente en ratones inmunodeficientes para derivar teratomas, tumores en los que pudieron comprobar la aparición de múltiples tipos celulares, de las tres hojas embrionarias, confirmando así su pluripotencia (Figura 2).

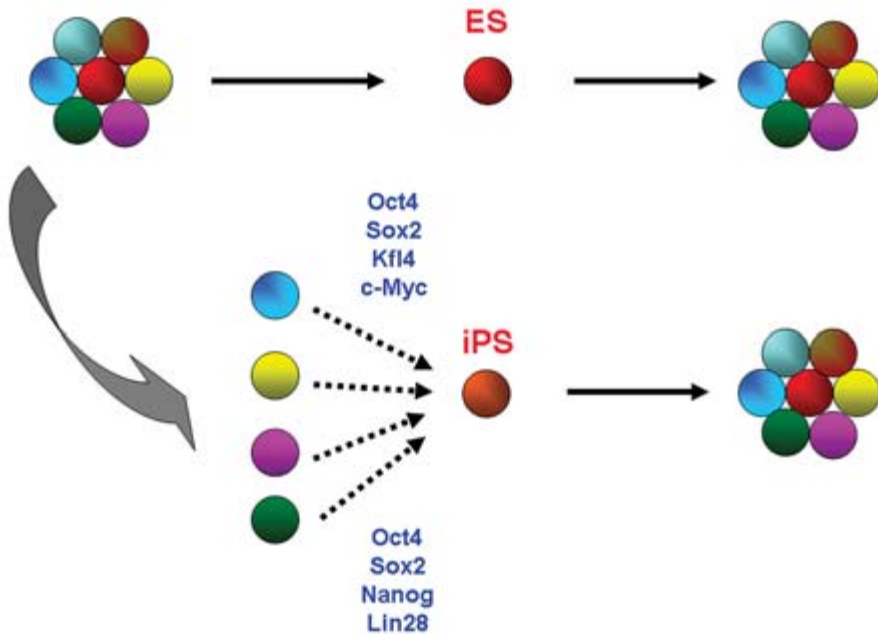


FIGURA 2. Células troncales pluripotentes embrionarias (ES) y células troncales pluripotentes inducidas (iPS). En este dibujo se presentan de forma esquemática las funciones más importantes de estos dos tipos celulares. Las células ES (arriba) son una manifestación de la línea germinal, la única que se transmite a la siguiente generación y la que va a dar lugar, de nuevo, en los futuros individuos, a todos y cada uno de los tipos celulares que conforman el organismo. Las células iPS (abajo) pueden obtenerse en principio a partir de cualquier tipo celular somático, mediante la reprogramación inducida por varias combinaciones de un reducido número de genes (se muestran las dos listas más utilizadas actualmente), son morfológica y funcionalmente indistinguibles de las células ES, y como las primeras, pueden dar lugar a todos y cada uno de los tipos celulares presentes en un individuo adulto.

Prácticamente de forma simultánea, aparecía el trabajo del grupo de Yamanaka en el que demostraban que también ellos eran capaces de reproducir sus resultados pioneros obtenidos en células de ratón ahora

en células humanas. En concreto, Takahashi y colaboradores nos mostraron que la modificación de fibroblastos humanos con los homólogos de los cuatro mismos genes usados en ratón, *OCT3/4*, *SOX2*, *KFL4* y *c-MYC* era suficiente para inducir células troncales pluripotentes inducidas (iPS) humanas (23).

Poco tiempo después, a principios del 2008, un tercer laboratorio demostraba que también era capaz de generar células iPS humanas a partir de células somáticas mediante un procedimiento de inducción genética con los mismos cuatro genes utilizados por el equipo japonés (24). En este caso, la novedad residía en la utilización de células somáticas obtenidas tanto de células fetales, neonatales como procedentes de adultos, de cultivos de células primarias de individuos adultos sanos, lo cual demostraba que era igualmente posible derivar estas mismas iPS a partir de individuos afectados de patologías. Tras demostrarlo en células de ratón, el equipo de Yamanaka también logró derivar iPS humanas a partir del uso de tres genes, excluido el *C-MYC*, con lo cual se evitaba la tumorigénesis asociada a este gen (19).

En células humanas, también se han explorado los mecanismos de reprogramación para minimizar el número de genes que es necesario transferir, en combinación con drogas que inhiban o bloqueen determinadas rutas metabólicas o de señalización celular. En este sentido, el equipo de Melton demostró que era posible obtener células iPS a partir de fibroblastos humanos mediante la introducción de *OCT3/4* y *SOX2*, y la exposición de las células a un inhibidor de histonas deacetilasas (25).

La diversidad de tipos células somáticos que pueden usarse para generar las correspondientes células iPS no parece tener límites. Muy recientemente se ha descrito la obtención de células pluripotentes inducidas a partir de células sanguíneas humanas, linfocitos (26). De nuevo se constata que las iPS generadas son indistinguibles morfológica y funcionalmente de las células ES. También se han logrado obtener células iPS humanas a partir de células obtenidas de un pelo, de queratinocitos, en los que se ha constatado que la eficiencia del proceso es mucho mayor que el proceso de reprogramación que se consigue en fibroblastos humanos (27).

POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LAS CÉLULAS iPS

El potencial terapéutico de estas células iPS es enorme. Si realmente son indistinguibles de las células pluripotentes embrionarias, comportándose como ellas y dando lugar, mediante procesos de diferenciación celular, a cualquier tipo celular existente en el cuerpo, pueden ser la fuente celular inagotable que necesitaba la medicina regenerativa, sin mediar ni requerir el uso de embriones. Un esquema terapéutico simple podría ser el siguiente: una persona que padeciera una patología congénita o degenerativa, que afecta principalmente a un tipo celular, podría donar cualquiera de sus células adultas sanas para, mediante un procedimiento de inducción genética, obtener células troncales pluripotentes inducidas (iPS) a partir de las cuales derivar, mediante diferenciación, el tipo de células dañadas o en degeneración que se quisiera substituir o reparar. Por un lado el procedimiento, sobre el papel, 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 troncales embrionarias, para lo cual se diseñó el procedimiento, teórico (solo comprobado en ratones) de la clonación terapéutica (28).

En efecto, el grupo de Rudolf Jaenisch, además de ser el primero que verificó, en un experimento pionero en ratones, que la clonación terapéutica era posible (28) fue el mismo quien, cinco años más tarde, en el campo de las células iPS, puso a punto un procedimiento terapéutico que sirvió para confirmar, por vez primera, el potencial terapéutico de estas células troncales pluripotentes inducidas, en ratones (29). En este trabajo, partiendo de un modelo experimental en ratones de anemia falciforme, se obtuvieron células iPS de estos ratones, en cultivo se modificaron genéticamente para corregir el defecto genético asociado al gen de las beta 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 reintrodujeron las nuevas, que reconstituyeron todo el sistema inmune, y en particular dieron lugar a los nuevos eritrocitos, sin la anemia falciforme, curando la patología del animal (29).

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, acaba de demostrar que es posible obtener cardiomiocitos funcionales a partir de células iPS obtenidas de células somáticas humanas (30), 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 troncales 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 (31).

El uso de estrategias de reactivación de los cuatro genes relevantes para la reprogramación celular que eviten el uso de vectores virales integrativos, 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 elegantes 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 la recombinasa Cre (32). En el mismo trabajo, el grupo de Jaenisch logra obtener células iPS a partir de fibroblastos de pacientes afectados por la enfermedad de Parkinson (32). Otra estrategia novedosa recientemente publicada 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, escindidos, mediante transposición, utilizando las herramientas del sistema *piggyBac* (33, 34).

En conclusión, el potencial terapéutico de las células troncales pluripotentes inducidas es enorme. Cuánto de este potencial se convertirá en una realidad lo sabremos pronto. Todavía quedan muchos interrogantes por contestar, a pesar de que en plazos muy cortos de tiempo se han ido solventando barreras que parecían insalvables hace muy poco (evitar el uso de *c-Myc*, evitar el uso de vectores retrovirales, evitar la modi-

ficación 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 poco más de dos años de existencia, el campo de las células iPS ha producido casi un millar 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 revolucionario, rompedor, sorprendente del descubrimiento de Takahashi y Yamanaka, y también de su robustez, de su alto grado de reproducibilidad, en definitiva, de la credibilidad y relevancia de todos estos estudios. La investigación en células troncales pluripotentes pasó por su punto más bajo en 2006, por las razones expuestas anteriormente, pero tras tocar fondo, rebotó con una fuerza inusitada, explotó en 2007 y 2008 y sigue en su ascenso geométrico, meteórico del que todos esperamos que pronto puedan derivarse realidades terapéuticas que puedan compensar las enormes esperanzas que estas investigaciones han suscitado entre pacientes afectados por enfermedades incurables o degenerativas, o en la sociedad en general.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Takahashi K y Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676.
2. Kennedy D (2006) Editorial Retraction of Hwang et al. Papers. *Science* **311**, 335.
3. Junying Yu, Maxim A. Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L. Frane, Shulan Tian, Jeff Nie, Gudrun A. Jonsdottir, Victor Ruotti, Ron Stewart, Igor I. Slukvin y James A. Thomson (2007) Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* **318**, 1917 - 1920.
4. Kazutoshi Takahashi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda y Shinya Yamanaka (2007) Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 1-12.
5. Evans MJ y Kaufman MH (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156.
6. Martin GR (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7634-7638.

7. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS y Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147.
8. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR y Gearhart JD (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13726-13731.
9. Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE y Jaenisch R (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* **448**, 318-324.
10. Okita K, Ichisaka T y Yamanaka S (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313-317.
11. Meissner A, Wernig M y Jaenisch R (2007) Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* **25**, 1177-1181.
12. Takahashi K, Okita K, Nakagawa M y Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat Protoc.* **2**, 3081-3089.
13. Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T y Yamanaka S (2008) Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* **321**, 699-702.
14. Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, Creighton MP, Steine EJ, Cassady JP, Foreman R, Lengner CJ, Dausman JA y Jaenisch R (2008) Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* **133**, 250-264.
15. Kim JB, Zaehres H, Wu G, Gentile L, Ko K, Sebastiano V, Araúzo-Bravo MJ, Ruau D, Han DW, Zenke M y Schöler HR (2008) Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* **454**, 646-650.
16. Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, 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 BK, Zaehres H y Schöler HR (2009) Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell* **136**, 411-419.
17. Welstead GG, Schorderet P y Boyer LA (2008) The reprogramming language of pluripotency. *Curr Opin Genet Dev.* **18**, 123-129.
18. Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW y Smith A (2008) Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol.* **6**, e253.
19. Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N y Yamanaka S (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* **26**, 101-106.
20. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G y Hochedlinger K (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* **322**, 945-949.

21. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T y Yamanaka S (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* **322**, 949-953.
22. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II y Thomson JA (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-1920.
23. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K y Yamanaka S (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-872.
24. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW y Daley GQ (2008) Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* **451**, 141-146.
25. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, Muhlestein W y Melton DA (2008) Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol.* **26**, 1269-1275.
26. Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Ng K y Daley GQ (2009) Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* Mar 18.
27. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Biliã J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S y Belmonte JC (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol.* **26**, 1276-1284.
28. Rideout WM III, Hochedlinger K, Kyba M, Daley G y Jaenisch R (2002). Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* **109**, 17-27.
29. Hanna J, Wernig M, Markoulaki S, Sun CW, Meissner A, Cassady JP, Beard C, Brambrink T, Wu LC, Townes TM y Jaenisch R (2007) Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* **318**, 1920-1923.
30. Zhang J, Wilson GF, Soerens AG, Koonce CH, Yu J, Palecek SP, Thomson JA y Kamp TJ (2009) Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res.* **104**, e30-41.
31. Gallicano GI, Golestaneh N, Kokkinaki M, Pant D, Jiang J, Destefano D, Fernandez-Bueno C, Rome JD, Haddad BR y Dym M (2009) Pluripotent Stem Cells Derived from Adult Human Testes. *Stem Cells Dev.* Mar 12.
32. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, Gao Q, Bell GW, Cook EG, Hargus G, Blak A, Cooper O, Mitalipova M, Isaacson O y Jaenisch R (2009) Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* **136**, 964-977.
33. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK y Nagy A (2009)

- piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* Mar 1.
34. Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P y Woltjen K (2009) Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* **458**, 771-775.