

¿SON CLÍNICAMENTE ÚTILES LAS CÉLULAS IPS?



Universidad
Católica
de Valencia

JUSTO AZNAR

**DIRECTOR DEL INSTITUTO
DE CIENCIAS DE LA VIDA**

ABRIL 2010

CÉLULAS MADRE. PASADO Y FUTURO

PASADO



**James Thomson
1998**

Cultivan por primera vez células madre embrionarias humanas

FUTURO



**Shinya Yamanaka
2006**

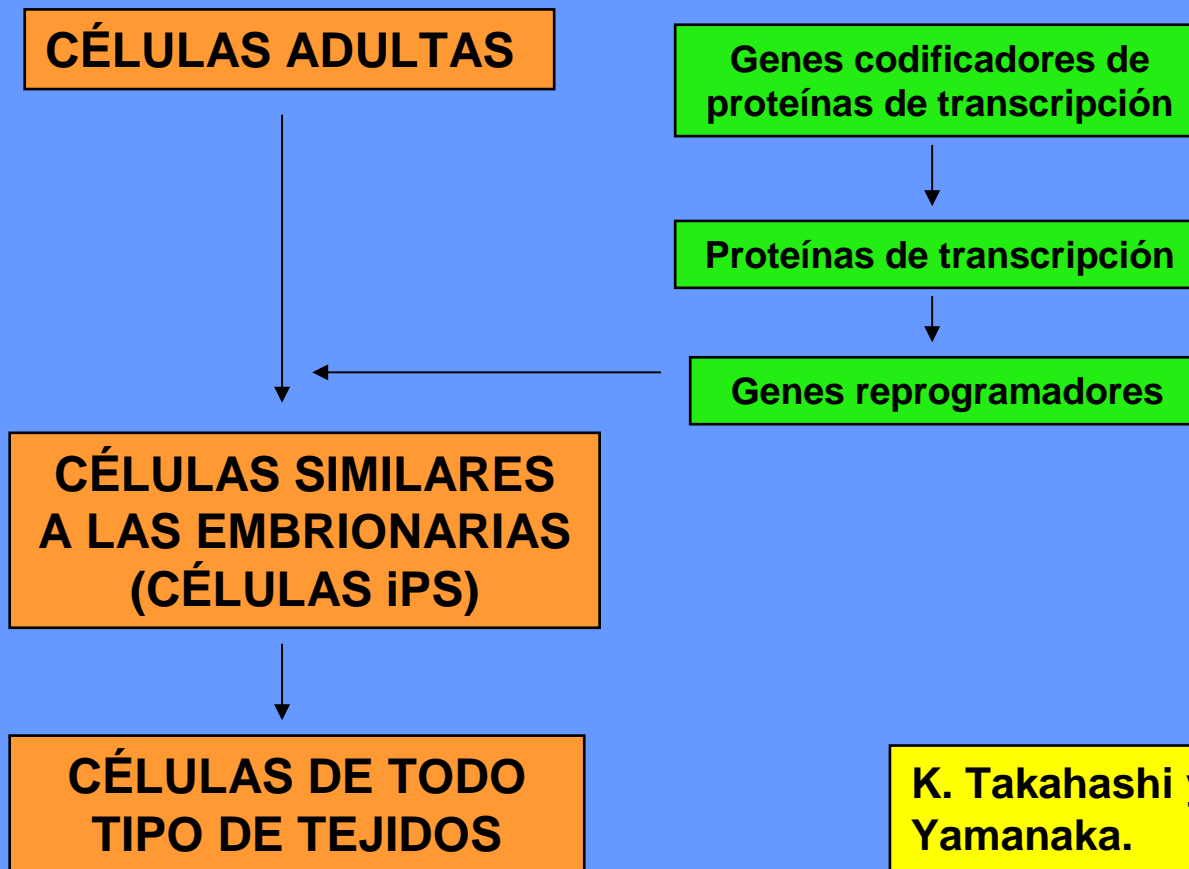
Obtienen células similares a las embrionarias por reprogramación de células adultas. Nacen las células iPS



2007

Obtienen células iPS humanas

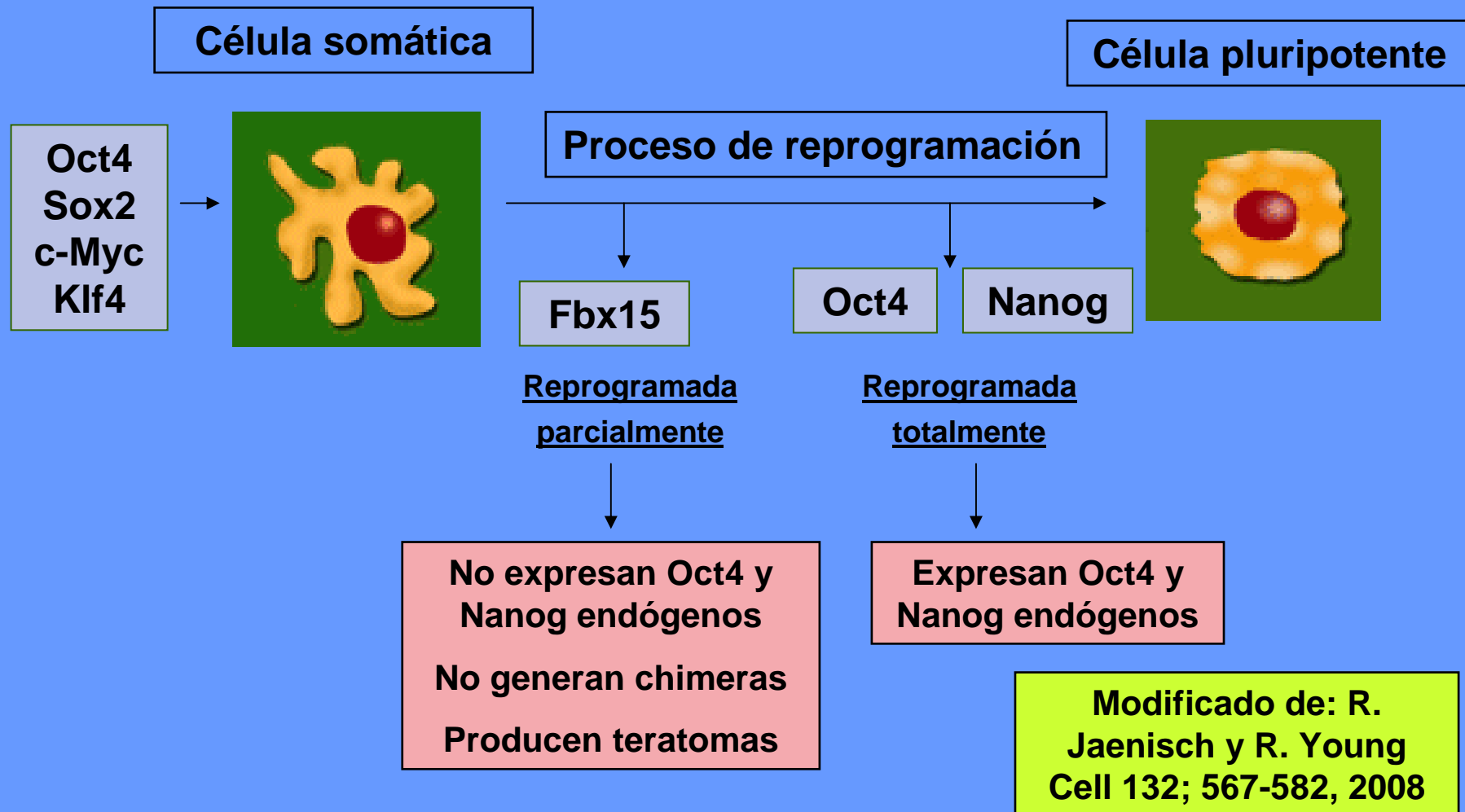
REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS ANIMALES



K. Takahashi y S. Yamanaka.

Cell 126; 652-655, 2006

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS A UN ESTADO PLURIPOTENTE



REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS MURINAS

- **Okita et al (Yamanaka)**
Nature 448; 313-317, 2007
- **Wernig et al (Jaenisch)**
Nature 448; 318-324, 2007
- **Meissner et al (Jaenisch)**
Nature Biotechnology 25; 1177-1181, 2007
- **Maherali et al**
Cell Stem Cell 1; 55-70, 2007

En estos trabajos se consigue la creación de quimeras con la identidad genómica de las células adultas

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS HUMANAS

**Pero el paso de las experiencias animales a humanos
no parecía fácil**

Así, Janet Rossant se preguntaba recientemente:

***“¿Serán eficientes los mismos mágicos factores
moleculares para generar células iPS humanas?”***

***Diversos grupos están intentándolo, pero trasladar
estas pruebas a humanos tiene muchas
dificultades”***

J. Rossant. Nature 448; 260-262, 2007

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS HUMANAS

- En noviembre de 2007, 16 meses después de la publicación de las experiencias de reprogramación celular en animales llevadas a cabo por Takahasi y Yamanaka se consigue, por el propio grupo de Yamanaka y el de Thomson, la reprogramación de células adultas humanas.
- Contrasta esta rapidez con los 17 años que transcurrieron desde que se obtuvieron células madre embrionarias de ratones¹ hasta que se consiguió lo mismo en humanos².

1. M Evans y col
Nature 292; 154-156, 1981
JR Martin
PNAS 78; 763-7638, 1981

2. JA Thomson y col
Science 282; 1145-1147, 1998

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS HUMANAS ADULTAS

- **Yu et al (Thomson)**
Science 318; 1917-1920, 2007
- **Takahasi et al (Yamanaka)**
Cell 131; 861-872, 2007
- **Park et al (Daley)**
Nature 451; 141-146, 2008
- **Lowry et al**
PNAS 105; 2883-2888, 2008

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS HUMANAS

Las células iPS generadas muestran expresión génica y modelos de metilación muy parecidos a los de las células madre embrionarias, crecen internamente mientras expresan telomerasa, tienen un cariotipo normal y forman teratomas si se trasplantan a ratones inmunosuprimidos

SIMILITUD ENTRE LAS CÉLULAS iPS Y LAS EMBRIONARIAS HUMANAS

Biológicamente no hay diferencias entre las células iPS y las embrionarias humanas, aunque para confirmarlo totalmente habría que producir embriones humanos por clonación a partir de las células iPS y comprobar la similitud biológica de sus células embrionarias con las de embriones obtenidos por fecundación in vitro o transferencia nuclear somática, lo cual éticamente no es posible llevar a cabo

GENES REPROGRAMADORES

¿Cuántos genes se requieren para obtener las células iPS?

GENES REPROGRAMADORES

**Takahasi y Yamanaka
Partieron de 24 genes
reprogramadores**

Cell 126; 663-676, 2006

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

GENES REPROGRAMADORES

El Oct4 es altamente específico para las células pluripotentes

**Los otros tres factores se expresan en otras células:
Sox2 en células madre neurales y células progenitoras**

Klf4 en células de piel, estómago, intestino y músculo esquelético

c-Myc se expresa aleatoriamente

El único gen que parece no puede ser reemplazado para la reprogramación es el Oct4

Nakagawa et al (Yamanaka)

Nature Biotechnology 26; 101-106, 2008

GENES REPROGRAMADORES

Las células somáticas se han podido reprogramar con menos genes reprogramadores

Kim et al demostraron que se pueden conseguir células iPS reprogramando células madre neurales utilizando como factor de transcripción únicamente el Oct4

Kim et al

Cell 136; 411-419, 2009

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

INCONVENIENTES TÉCNICOS

Lo que puede facilitar una integración genómica aleatoria y riesgo de ocasionar mutagénesis

Además, aunque los genes reprogramadores son generalmente silenciados después de la reprogramación, la activación epigenética del Oct-4 y Sox2 podría inducir efectos no deseados en las células iPS transferidas

PROBLEMAS RESUELTOS

El mismo grupo de Yamanaka, en el reducido tiempo de tres meses, consigue reprogramar hepatocitos y células de epitelio de mucosa gástrica sin utilizar el c-Myc, tanto en humanos como en ratones, sin que se generaran tumores

N. Nakagama y col. Nature Biotechnology 26; 101-106, 2008

PROBLEMAS RESUELTOS

Otros autores también consiguen generar células sin utilizar el c-Myc

1. Wernig M y col

Cell Stem Cell 2; 10-12, 2008

2. T Brambrink y col

Cell Stem Cell 2; 151-159, 2008

OBTENCIÓN DE CÉLULAS iPS SIN INTEGRACIÓN DEL GENOMA VIRAL

Generan células iPS a partir de:

- **Hepatocitos de ratón utilizando adenovirus para transferir factores reprogramadores**

Stadtfeld et al

Science 322; 945-949, 2008

- **Fibroblastos de embriones de ratón utilizando plásmidos**

Okita et al (Yamanaka)

Science 322; 949-953, 2008

Kaji et al

Nature DOI: 10.1038/nature 07864, 2009

FACTORES DE REPROGRAMACIÓN

Producción de células iPS utilizando:

Vectores episomales que no se integran en el genoma de la célula generada. Los restos genómicos episomales que queden se eliminan y así la célula iPS generada queda libre de secuencias transgénicas extrañas

Yu et al (Thomson)

Science 324; 797-801, 2009

Utilizan doxyciclina para potenciar la acción de los vectores víricos (lentivirus) y posteriormente la recombinasa Cr/LoxP para eliminar los restos transgénicos que se hayan podido insertar

Soldner et al

Cell 136; 964-977, 2009

Utilizan plásmidos del tipo piggy Bac

Woltjen et al

Nature DOI: 10.1038/nature 07863.2009

OBTENCIÓN DE CÉLULAS iPS SIN INTEGRACIÓN DEL GENOMA VIRAL

Posibilidad de crear células iPS utilizando un único vector policistrónico no vírico obtenido a partir de un plasmido que favorece la expresión de Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc, que evita la inserción del genoma vírico en las células generadas

Gonzalez et al

PNAS 106; 8918-8922, 2009

OBTENCIÓN DE CÉLULAS iPS SIN INTEGRACIÓN DEL GENOMA VIRAL

Utilizando un microRNA se pueden reprimir los factores de transcripción Oct4, Klf4 y Sox2

Kosic et al

Cell DOI: 10.1016/j.cell.02038, 2009

GENERACIÓN DE CÉLULAS iPS UTILIZANDO COMPUESTOS QUÍMICOS

**Utilizan productos químicos
que pueden reemplazar uno o
dos genes reprogramados**

Huangfu et al

Nature Biotechnology 26; 1269-1275, 2008

Shi et al

Cell Stem Cell 2; 525-528, 2008

GENERACIÓN DE CÉLULAS iPS UTILIZANDO PEQUEÑAS MOLÉCULAS

**Pequeñas moléculas que inhiben el
ácido valpróico inducen reprogramación
utilizando solo Oct4 y Sox2**

**Otra molécula, el kenpaulné, puede
sustituir el Klf4**

PNAS 106; 8912-8917, 2009

**POSIBLES
UTILIZACIONES DE LAS
CÉLULAS iPS**

POSIBLE UTILIDAD DE LAS CÉLULAS iPS

En principio podrían tener tres posibles aplicaciones:

Para estudios experimentales sobre la diferenciación celular y para valorar posibles diferencias entre células normales y patológicas

Para estudios farmacológicos, que ahora solo es posible realizar en animales

Para su uso en la medicina regenerativa

UTILIDAD EXPERIMENTAL DE LAS CÉLULAS iPS

**Las células iPS podrían suplir
mucha de la información que
ahora proporcionan las células
madre embrionarias en
investigación y en medicina**

MF Pera Nature 451; 135-136, 2008

EXPERIENCIAS PRE CLÍNICAS

La posibilidad de generar células iPS de pacientes concretos ha abierto la puerta a la medicina personalizada regenerativa por un camino éticamente correcto

Kiskinis E and Eggan K. J Clin Invest 2010; 120: 51-59

EXPERIENCIAS PRECLÍNICAS EN RATONES CON ANEMIA FALCIFORME

Se obtienen células somáticas de ratones con anemia falciforme y tras ser corregida la anomalía genética por técnicas de biología molecular se generan células iPS

A partir de ellas se generan células madre 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

Demuestran que células iPS se pueden diferenciar en células madre precursoras neurales que en cultivo puede generar células neurales o de glia

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

También las células iPS se diferencian a neuronas dopaminérgicas

Cuando las neuronas dopaminérgicas se transplantan 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

EXPERIENCIAS PRECLÍNICAS EN RATONES CON HEMOFILIA A

Se producen células iPS a partir de fibroblastos de la cola de ratones que posteriormente se diferencian a células endoteliales y células progenitoras endoteliales.

Se comprueban que estas células producen factor VIII

**Las células endoteliales o sus progenitoras producidas se inyectan a ratones con hemofilia A
Se comprueba que el factor VIII se incrementa hasta un nivel de 8% a 12%**

Comprobándose que los ratones transplantados sobreviven mucho mas tiempo que los a ratones del grupo control

EXPERIENCIAS PRECLÍNICAS EN RATONES CON INFARTO DE MIOCARDIO

**A partir de fibroblastos humanos se producen células
iPS**

Estas se insertan en mórulas de ratones

**De las quimeras producidas, se produce parenquima
cardiaco normal, que se puede transferir a
corazones de ratones enfermos, consiguiendo la
mejora funcional de los mismos**

**Esto demuestra que las células iPS pueden ser útiles
en el tratamiento de la enfermedad cardiaca**

Nelson et al

Circulation 120; 408-416, 2009

**LÍNEAS CELULARES
OBTENIDAS DE CELULAS IPS
DERIVADAS DE PACIENTES
CON DISTINTAS PATOLOGÍAS**

LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS

La posibilidad de generar células iPS a partir de células somáticas, generalmente fibroblastos, ha abierto un nuevo y útil camino para estudiar la patogenia de graves enfermedades, así como para ensayar nuevas posibilidades terapéuticas para ellas

LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS

Las primeras experiencias en este sentido lograron derivar, de fibroblastos de una mujer de 82 años que padecía una esclerosis lateral amiotrófica, células iPS y posteriormente diferenciarlas a neuronas motoras, similares a las destruidas en la paciente

Dimos J, et al. Science 2008; 321: 1218-1221.

LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS

También se han podido derivar células iPS en pacientes con síndrome Shwahan-Bodian-Diamond, enfermedad de Gaucher de tipo 3, distrofia muscular de Duchenne, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Down y síndrome de Lesch-Nyhan

Park I H, et al. Cell 2008; 134: 877-886

LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS

Igualmente a partir de fibroblastos de piel de un niños con atrofia muscular espinal se han podido derivar células iPS que mantenían el genotipo de esta enfermedad de las que se pudieron derivar neuronas motoras con el trastorno genético de estos pacientes

Ebert A, et al. Nature 2009; 457: 277-280

**LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE
CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES
CON DISTINTAS PATOLOGÍAS**

**En marzo de 2009 a partir de
fibroblastos de 5 pacientes con
enfermedad de Parkinson se
pudieron producir neuronas
dopaminérgicas**

Soldner F, et al. Cell 2009; 136: 964-977

LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS

En julio de 2009 se logró también obtener células iPS de pacientes con anemia de Fanconi con la particularidad de que las células somáticas fueron previamente tratadas con terapia génica para corregir su defecto genético, por lo que las células iPS producidas eran normales siendo posiblemente útiles para ser transplantadas a pacientes con anemia de Fanconi

Raya A, et al. Nature 2009; 460: 53-59

**LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE
CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES
CON DISTINTAS PATOLOGÍAS**

**También a partir de células CD34⁺
obtenidas de sangre de dos
pacientes con trastornos
mieloproliferativos se han
obtenido células iPS que podrían
servir para profundizar en el
estudio de la patogenia de esta
enfermedad**

**LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE
CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES
CON DISTINTAS PATOLOGÍAS**

**También de pacientes con
disautomanía, una neuropatía causada
por una mutación genética puntual, se
han podido desarrollar células iPS
sobre las cuales se han
experimentados nuevos fármacos para
tratar esta enfermedad**

Lee G, et al. Nature 2009; 461: 402-406

LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS

Finalmente también se han podido derivar células iPS de pacientes con diabetes mellitus de tipo 1. Estas células denominadas DiPS se han podido diferenciar en células productoras de insulina, por lo que podrían ser útiles tanto para estudiar la patogenia de la enfermedad como para abrir una nueva expectativa terapéutica para estos pacientes

Maehr R, et al. PNAS 2009; 106: 15768-15773

**POSIBILIDAD DE
PRODUCIR SERES
VIVOS A PARTIR DE
CELULAS IPS**

POSIBILIDAD DE PRODUCIR SERES VIVOS A PARTIR DE CELULAS IPS

A partir de células iPS, además de poder obtenerse líneas celulares de distintas patologías también se han podido derivar células germinales, que en teoría podrían servir para producir seres humanos vivos

Kee K, et al. Nature 2009; 462: 222-225

Editorial. Nature 2008; 452:913

POSIBILIDAD DE PRODUCIR SERES VIVOS A PARTIR DE CELULAS IPS

Pero las experiencias más excitantes en este terreno han sido realizadas por dos grupo de investigadores chinos que han logrado producir ratones vivos a partir de células iPS

POSIBILIDAD DE PRODUCIR SERES VIVOS A PARTIR DE CELULAS IPS

El primero de ellos lo consiguió a partir de la producción de blastocistos tetraploides a los que se había previamente transferido las células iPS

Kang L, et al. Cell Stem Cell 2009; 5: 135-138

POSIBILIDAD DE PRODUCIR SERES VIVOS A PARTIR DE CELULAS IPS

Pero más interesante aun han sido las experiencias de Zhao y col que han logrado producir 31 ratones vivos a partir de 37 líneas de células iPS generadas de fibroblastos de piel. La técnica utilizada ha sido similar a la de Kang por medio de la cual tras inyectar las células iPS en blastocistos normales estos fueron transferidos a hembras que quedaron preñadas. Los ratones generados tenían entre un 5% a 80% de quimerismo.

Pero lo más interesante de estas experiencias es que a partir de los ratones producidos se pudo producir una segunda generación de ratones vivos que tenían las características genéticas del ratón del cual se habían derivado las células iPS

POSIBILIDAD DE PRODUCIR SERES VIVOS A PARTIR DE CELULAS IPS

El último grupo en conseguir animales vivos a partir de células iPS ha sido el de Boland y col utilizando una técnica similar a la de Zhao, consiguiendo también que los embriones generados tuvieran también características genéticas similares a la de los ratones de los que se habían derivado las células iPS

Boland M, et al. Nature 2009; 461 91-94

BREVE CONSIDERACIÓN ETICA

BREVE CONSIDERACIÓN ETICA

No cabe duda que una de las características mas positivas de las células iPS es que no se requiere utilizar células madre embrionarias para obtenerlas

Sin embargo, al poder derivar de ellas, animales vivos, se abre la posibilidad de poder clonar seres humanos sin tener que recurrir a la transferencia nuclear somática

BREVE CONSIDERACIÓN ÉTICA

**Esto presupone que la
responsabilidad ética última
del uso de las células iP
queda en mano de los propios
investigadores, firmas
comerciales y la sociedad en
general**

