REVISTA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA PARA LAS CIENCIAS DEL ANIMAL DE LABORATORIO

ANIMALES DE LABORATORIO

Primavera 2014. Número 61

CÉLULAS MADRE

Células madre embrionarias en ratón: Técnicas y aplicaciones

Células madre embrionarias humanas: Presente y futuro

Células pluripotentes inducidas (iPS): Desarrollo y aplicaciones en investigación básica y clínica

Entrevista: Manuel Serrano
Director del Programa de Oncología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)

sociedad española para las ciencias del animal de laboratorio

harlan™

Centrados en su investigación.

Como proveedor global de modelos de alta calidad de investigación, dietas y servicios de asistencia, Harlan Laboratories ha demostrado su rendimiento con equipos de investigación en todo el mundo. Nuestra misión es la de ayudarle a mejorar sus investigaciones.

Para más información, visite nuestra Web www.harlan.com o contacte con nosotros en rms.es@harlan.com

Modelos

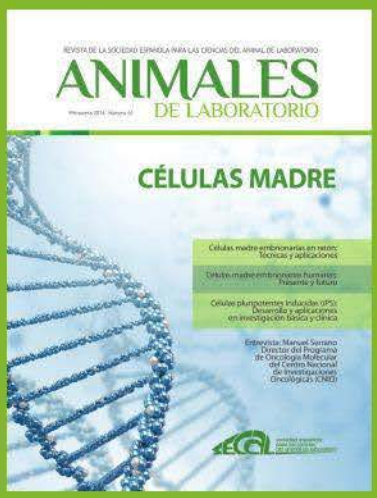
Dietas

Servicios

©2010 Harlan Laboratories, Inc.
Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better, and the Harlan logo are trademarks of Harlan Laboratories, Inc.
www.harlan.com

GRUPO EDITOR

Grupo Editor



REVISTA DE LA SOCIEDAD
ESPAÑOLA PARA LAS
CIENCIAS DEL ANIMAL
DE LABORATORIO
www.secal.es
DIRECTORA
Teresa Rodrigo Calduch
direccion.revista@secal.es
SUBDIRECTOR
Hernán Serna Duque
direccion.revista@secal.es
EDITORES DE ESTILO E IMAGEN
Olga Fernández Rodríguez
Juan de Dios Hourcade Bueno
Lara Sedó Cabezón
PUBLICIDAD
Amaia Enbeita
publicidad.revista@secal.es
FOTOGRAFÍA DE PORTADA
Shutterstock
DISEÑO Y MAQUETACIÓN
CONEXION E.P.
clientes@agenciaconexion.com.co
IMPRIME
LCS REPROGRAF
DEPÓSITO LEGAL
M-1362-1999

Responsables Secciones

NOTICIAS SECAL
ACTUALIDAD
Cristina Gerbolés Freixas
kgerboles@gmail.com

TÉCNICAS
María Granada Picazo
mgpicazo@sescam.jccm.es

ÉTICA Y LEGISLACIÓN
SEGURIDAD EN 5 MINUTOS
Jesús Martínez Palacio
jesus.martinez@ciemat.es

¿ Y TÚ QUÉ OPINAS?
José Luis Martín Barrasa
jlmbarrasa@gmail.com

LIBROS Y PÁGINAS WEB
Daniel Baizán Vicent
baizan@vivotecnia-ms.com

FACTOR HUMANO
Javier Fidalgo Fernández
fidalgo@ocelata.com

Junta de Gobierno

PRESIDENCIA
Javier Guillén Izco (2011-2015)

VICEPRESIDENCIA
Antonio Martínez Escandell (2013-2017)

SECRETARÍA
Elena Ciordia Balduz (2011-2015)

VICESECRETARÍA
Angel Naranjo Pino (2013-2017)

TESORERÍA
Isabel Blanco Gutiérrez (2011-2015)

VICETESORERÍA
Carlota Largo Aramburu (2013-2017)

VOCALÍAS
Rosa Bonavía Abril (2011-2015)
Juan de Dios Hourcade Bueno (2013-2017)
Leticia Martínez Caro (2011-2015)
NorayBio (2013-2017)
Luis Parra García (2011-2015)
Anna Puyol ALtarriba (2011-2015)
María Reyes Panadero (2013-2017)
Juan Rodríguez Cuesta (2013-2017)

SOCIOS BENEFACTORES:
ANADE
ANIMALARIA
ANTONIO MATACHANA S.A.
BIOESCAPE Gmbh
BIOSIS S.L.
CENTRE D'ELEVAGE JANVIER
CHARLES RIVER LABORATORIES
DINOX S.L.
DYNAMIMED
ETYCA S.L.
GLAXO SMITHKLINE
GRANJA S. BERNARDO
HARLAN LABORATORIES MODELS
MEVION TECHNOLOGY S.L
IZASA S.A.
NIRCO S.L.
NORAY BIOINFORMATICS S.L.U.
PANLAB S.L.U.
RETTENMAIER IBERICA S.L.
SODISPAN RESEARCH SL
SOURALIT
SDS DIETEX FRANCE
STERILTECH S.L.
STERIS
VESTILAB S.A.
VIVOTECNIA

SERVICES

CUSTOMIZED BREEDING SERVICES

REPRODUCTIVE SCIENCES

SPERM OR EMBRYO COLLECTING

STRAIN DECONTAMINATION

CRYOPRESERVATION OF SPERM[1] AND EMBRYOS

IN VITRO FERTILIZATION

CRYOSTORAGE OF MODELS (CRYO-BANK)

REVITALIZATION OF FROZEN EMBRYOS

[1] Revitalization of cryopreserved sperm involving use of JAX® Mice strains is performed by The Jackson Laboratory.

JAX® is a registered trademark of The Jackson Laboratory.
All rights reserved.

AD-HOC COMMUNICATION • 02 23 41 11 800 - Photo credit: JANVIER S.A.S

Tel.: +33 (0) 2 43 02 90 28
Fax: +33 (0) 2 43 02 00 15
E-mail : myproject@janvier-europe.fr
www.janvier-europe.com

JANVIER
THE REFERENCE

afaq ISO 9001 Qualité
AFNOR CERTIFICATION

ANIMALES DE LABORATORIO
Primavera 2014. Número 61

ÍNDICE

EDITORIAL

7 NOTICIAS
- Actividades de la SECAL.

10 ACTUALIDAD
- Embriones de pez revelan un mecanismo clave en el síndrome de Usher.
- Visualización de la generación de aterosclerosis *in vivo*, en alta resolución .
- Descubierto el mecanismo cerebral que conecta el olfato con el apetito.
- Reprogramación de células somáticas de mamíferos mediante estrés ambiental.

15 ARTÍCULOS
- Células madre: Introducción.
- Células madre embrionarias en ratón: Técnicas y aplicaciones.
- Células madre embrionarias humanas: Presente y futuro.
- Células pluripotentes inducidas (iPS): Desarrollo y aplicaciones en investigación básica y clínica.
- Células troncales en vertebrados y sus aplicaciones al estudio y conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción.
- El coste de la inmortalidad: Alteraciones genéticas y epigenéticas de las ESCs e iPSCs.

50 FACTOR HUMANO
- Emociones, trabajo y resultados.

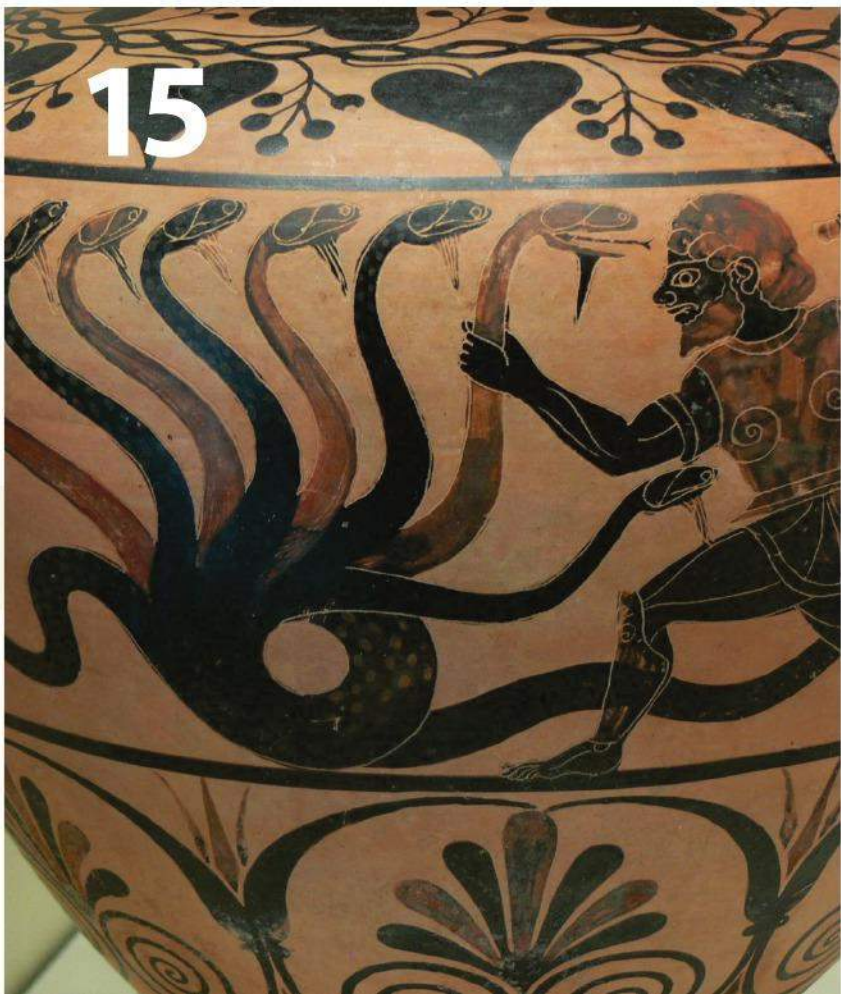
55 LIBROS Y PÁGINAS WEB
- El portal de la Sanidad Animal.

57 ¿Y TÚ QUÉ OPINAS?
- Viajar "despierta"... No sólo la curiosidad.

61 SEGURIDAD EN 5 MINUTOS
- La percepción de las causas de los accidentes.

62 ENTREVISTA
- Manuel Serrano.

66 CRUSECAL



sociedad española para las ciencias del animal de laboratorio

Células Madre

Aunque no exenta de la polémica ética en su utilización de embriones humanos, la investigación con células madre ha demostrado su gran potencial en la comprensión y el tratamiento de enfermedades.

De hecho, los estudios realizados en animales han demostrado su gran capacidad para tratar enfermedades hematológicas, diabetes tipo 1, parkinson, entre otras. Y es indudable que es un campo totalmente actual y de gran interés tanto científico como social. De hecho, en el momento de redactar esta editorial, una búsqueda en *google* con las palabras "investigación con células madre en España" y limitándolo a las últimas 24 horas ha dado lugar a 1.260 resultados (44 resultados si se limitaba a la última hora). Y eso sólo en España. Y a la vez descubrimos una noticia reciente sobre una nueva área de investigación con células madre en ratones que llaman "walking", como modelo de esclerosis múltiple.

En este número y bajo la coordinación de Belén Pintado, encontrareis una serie de artículos que presentan desde una breve introducción de la investigación con células madre hasta el desarrollo y principales aplicaciones de las células madre embrionarias de ratón, humanas y las más recientes células pluripotentes inducidas, así como los principales problemas tanto técnicos como funcionales de las mismas y que suponen los retos actuales en investigación básica y aplicada. También encontrareis un artículo en el que se expone la aplicabilidad de las células madre en un área menos conocida que la investigación biomédica, la de la conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción.

A pesar de que su enorme potencial provoque debates éticos e incluso muchos países hayan establecido regulaciones para evitar su uso indiscriminado, es indudable que, actualmente, la investigación con células madre es crucial para el avance en nuestra eterna lucha contra el dolor y las enfermedades.

Dirección Revista SECAL

Actividades de la SECAL

El 7 de abril de 2014 se celebró la Reunión Ordinaria de la Junta de Gobierno de la SECAL. A continuación se presenta un resumen de los principales temas tratados.

Relaciones internacionales

Federation of Laboratory Animal Science Associations (FELASA)

Se ha propuesto un grupo de trabajo conjunto AALAS-FELASA para fijar términos de referencia para el transporte de animales. El grupo estará formado por miembros de ambas asociaciones.

International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS)

Se han aprobado ocho nuevas becas para estancias de formación en Europa. Estas adjudicaciones se publicarán en la web de ICLAS.

Laboratory Animals Ltd. (LAL)

LAL ha enviado a las asociaciones miembros la propuesta de homogeneizar el % mínimo de suscripciones necesarias de cada asociación para mantener el precio reducido. Hay otras propuestas como el cambio de la revista a formato electrónico, o abrir el mercado a USA y China.

AALAS-GPAC; e-learning library

Ya se ha dado de alta el grupo de la SECAL con 51 miembros; hasta el momento los comentarios que están llegando son positivos.

Relaciones nacionales

Relaciones con los Ministerios. Convenio MAGRAMA

Se han mantenido conversaciones con el MAGRAMA con el fin de organizar charlas informativas referentes al cumplimentado de las tablas para realizar los informes estadísticos de animales utilizados. Las nuevas tablas serán efectivas a partir del 2015 cumplimentándose con los datos de los animales usados en el 2014.

La sesión de Madrid se realizará el 24 de junio de 10 a 13 h en el Salón de Actos de la Facultat de Medicina de la UAM, y se grabará para que los socios que no puedan asistir puedan visualizarlo desde la página web de la SECAL.

Se está evaluando la posibilidad de repetir el seminario en Barcelona antes de finalizar el año 2014.

Por otra parte, el MAGRAMA tiene convenios de colaboración firmados con otras sociedades como REMA y propone que la SECAL formalice su relación con dicho ministerio a través de un convenio.

Confederación de Sociedades Científicas de España (COSCE)

Se ha creado un Nodo dentro de COSCE para comunicar sobre la investigación animal en España y contrarrestar la información ultra proteccionista que salga en los medios de comunicación.

Asociación Española de Bioseguridad (AEBios)

Ya se ha firmado el convenio con AEBios. Los socios de SECAL tienen un descuento del 30% en el congreso de AEBios que se celebrará en Barcelona en septiembre. Asimismo, SECAL también ofrecerá un descuento a los socios de AEBios para asistir al congreso de Cáceres.

Otras actividades

Congreso Cáceres 2015

El comité científico del congreso ha propuesto un total de 14 temas coordinados cada uno de ellos por una pareja hispano lusa.

El comité organizador ha fijado ya fecha para las inscripciones a precio reducido, 2 de octubre 2014. Se prevé que la página web del congreso esté disponible a finales de abril.

Formación

Se ha aprobado y firmado el convenio para formación *online* con la Universidad de Granada.

Grupos de trabajo

Ya está redactado el documento definitivo del grupo de trabajo de "Banco de Intercambio de Órganos y Tejidos". El MAGRAMA está interesado en que este documento se envíe a todos los centros y potenciar la creación de biobancos a nivel nacional.

También está muy avanzado el documento del grupo de trabajo de "Controles Microbiológicos".

Ambos documentos se publicarán en la revista "Animales de Laboratorio" y se intentará también publicarlos en *Laboratory Animals*.

steriltech

INSTRUMENTACIÓN E INSTALACIONES CIENTÍFICAS

C/. Laguna del Marquesado 14, Nave 1
28021 MADRID
Teléfono: 91 710 95 47
Fax: 91 796 65 52
E-mail: steriltech@steriltech.net
www.steriltech.net

Proteja su Investigación de la Contaminación con la Tecnología Clarus™
Peróxido de Hidrógeno Vaporizado

BiQQ BIOQUELL
Bio-decontamination solutions

- Totalmente escalable
- Libre de residuos
- Baja Temperatura
- Excelente compatibilidad de materiales

CLARUS™ Z
Especialmente diseñado para salas
- Salas hasta 500 m^3

CLARUS™ C
- SAS Biológicos
- Salas hasta 350 m^3
- Racks Ventilados
- Aisladores
- Lava-racks

CLARUS™ L
- Racks Ventilados
- Aisladores
- Incubadores de CO_2
- Lava-racks

BMT
MMM Group

BMT Iberia, s.l.
C/. Laguna del Marquesado 14, Nave 1
28021 MADRID
Teléfono: 91 7230347
Fax: 91 5054494
E-mail: bmtiberia@steriltech.net
www.bmtiberia.es

Esterilizadores a Vapor STERIVAP HP IL, VAKULAB, UNISTERI

Embriones de pez revelan un mecanismo clave en el síndrome de Usher

El síndrome de Usher (un raro trastorno genético que se caracteriza por sordera y pérdida gradual de la vista) es la principal causa de la sordoceguera congénita.

Los pacientes que sufren de síndrome de Usher presentan pérdida auditiva neurosensorial, retinitis pigmentosa y, en algunos casos, disfunción vestibular.

Según un trabajo realizado con embriones de pez medaka (*Oryzias latypes*), recientemente publicado en la revista PLoS ONE, el gen USH2A, asociado a este síndrome, parece jugar un papel fundamental en el desarrollo de los fotorreceptores de la retina y células cocleares.

Dado que los embriones de peces se comportan de manera similar a los embriones de mamíferos, y los ensayos están reconocidos por la comunidad científica, por la OECD, normas ISO y la legislación europea, los científicos trabajaron con embriones de pez medaka (*Oryzias latypes*), organismo que resulta muy útil como modelo para estudios genéticos, pues los resultados que se obtienen son equiparables a los que se conseguirían en mamíferos.

En este caso, se determinó la expresión y función del gen *Ol-Ush2a* cuya estructura, expresión y función es muy similar a *USH2A*, uno de los genes humanos implicados en el Síndrome de Usher tipo 2. Los resultados del estudio en embriones de pez medaka en diferentes etapas de desarrollo, sugieren que el gen *Ol-Ush2a* podría desempeñar un papel fundamental en el desarrollo o mantenimiento de fotorreceptores de la retina y las células ciliadas de la cóclea.

En este sentido, el defecto de *Ol-Ush2a* en el pez medaka causa defectos en el desarrollo embrionario (ojos y cabezas pequeños, malformaciones de otolitos y cuerpos acortados con la cola curvada).

≪ Un estudio en embriones de pez medaka en diferentes etapas de desarrollo, sugieren que el gen Ol-Ush2a podría desempeñar un papel fundamental en el desarrollo o mantenimiento de fotorreceptores de la retina y las células ciliadas de la cóclea ≫

En la investigación, liderada por la empresa biotecnológica valenciana Bionos Biotech, han colaborado científicos del CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), del Grupo de Investigación en Enfermedades Neurosensoriales del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, de la Unitat de Recerca del Hospital Joan XXIII, del Institut de Investigació Sanitaria Rovira i Virgili de Tarragona y de los Servicios de Oftalmología y Otorrinolaringología, así como de la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital La Fe de Valencia.

http://www.gacetamedica.com/noticias-medicina/articulo.aspx?idart=801810&idcat=797&tipo=2

http://www.lafe.san.gva.es/ca/resultados/-/journal_content/56_INSTANCE_8Yxh/18/132590

E. Aller, A.V. Sánchez-Sánchez, J.U. Chicote, G. García-García, P. Udaondo, *et al.* ***Analysis of the Ush2a Gene in Medaka Fish (Oryzias latipes).*** PLoS ONE 2013, 8(9): e74995. DOI:10.1371/journal.pone.0074995

Visualización de la generación de aterosclerosis *in vivo*, en alta resolución

Un equipo del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), ha logrado por primera vez visualizar en un modelo animal cómo se forma la placa de ateroma en grandes arterias con una alta resolución, nunca conseguida hasta ahora.

El inicio y desarrollo de la placa de ateroma es un proceso inflamatorio crónico que se caracteriza por la incorporación en la pared arterial de células del sistema inmune (monocitos, linfocitos y neutrófilos) y plaquetas de la sangre, las cuales participan de un modo muy activo en todas las fases de la enfermedad.

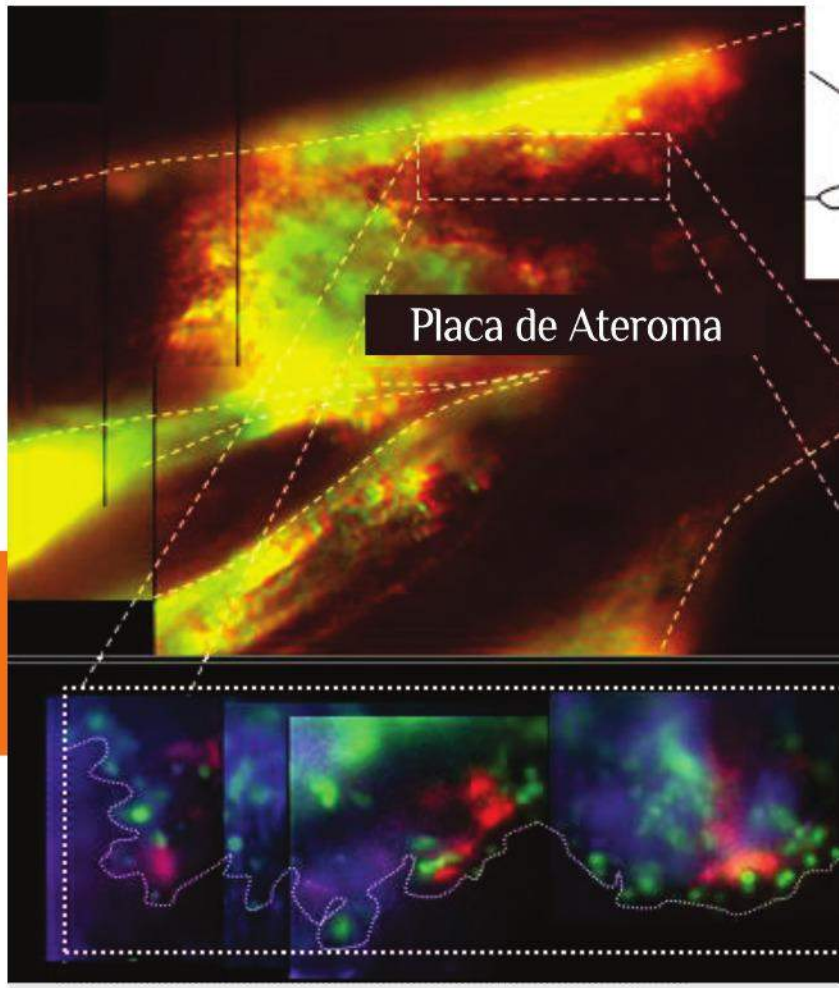
En el animal vivo, el proceso se ha estudiado detalladamente sólo en vasos de pequeño calibre. Sin embargo, los vasos que desarrollan placa de ateroma son grandes arterias afectadas por los movimientos respiratorios y pulsátiles, que ha impedido estudios de imagen de alta resolución.

≪Nueva tecnología basada en epifluorescencia multicanal de alta velocidad y sondas fluorescentes, que permite imágenes de alta resolución in vivo, de los leucocitos y las plaquetas inflamatorias dentro de la arteria carótida≫

Los procesos inflamatorios que inician y propagan la aterosclerosis siguen siendo poco conocidos, en gran parte debido a que definir el comportamiento intravascular de las células inmunes ha sido técnicamente difícil.

El equipo del CNIC ha desarrollado una nueva tecnología basada en epifluorescencia multicanal de alta velocidad y diversas sondas fluorescentes, que permite imágenes de alta resolución *in vivo*, de los leucocitos y las plaquetas inflamatorias dentro de la arteria carótida en cepas de ratones susceptibles al desarrollo de aterosclerosis.

Este método puede utilizarse en microscopia multifotón para obtener imágenes tridimensionales de leucocitos en movimiento sobre la pared arterial afectada por ateroesclerosis.



http://www.diariomedico.com/2014/01/15/area-cientifica/especialidades/cardiologia/investigacion/visualizan-como-se-genera-ateroesclerosis-resolucion-nunca-vista-hasta-ahora-

http://www.cnic.es/es/noticias/index.php?id=3837

R. Chèvre, J.M. González-Granado, R.T. Megens, V. Sreeramkumar, C. Silvestre-Roig, P. Molina-Sanchez, C. Weber, O. Soehnlein, A. Hidalgo and V. Andrés. ***High-Resolution Imaging of Intravascular Atherogenic Inflammation in Live Mice.*** Circulation Research 2014, 114(5): 770-9.

Descubierto el mecanismo cerebral que conecta el olfato con el apetito

Un estudio codirigido por el investigador Pedro Grandes de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) y publicado en la revista *Nature Neuroscience*, ha descubierto el mecanismo cerebral que conecta el olfato con el apetito. En concreto, es el receptor CB1 del bulbo olfatorio el encargado de estimular la percepción olfativa en estados de ayuno.

Los investigadores destacan que es común que el estado interno del organismo afecte a la percepción sensorial y, por tanto, provoque un determinado comportamiento. Uno de los ejemplos más conocidos de estos procesos es la capacidad del hambre de aumentar el olfato, y así aumentar la búsqueda e ingesta de comida.

Sin embargo, hasta ahora se desconocía el mecanismo cerebral que gobierna la conexión entre el hambre, el olfato y la ingesta de comida. Antes de la realización de este estudio, se sabía que el sistema cannabinoide estaba relacionado con estos fenómenos. Los cannabinoides endógenos son lípidos que se producen a demanda como consecuencia de la actividad neuronal, es decir, en situaciones en las que el sistema en concreto se activa.

Los investigadores que han realizado el presente estudio en ratones, han descubierto el tipo de cannabinoide endógeno que participa en estos procesos, el lugar en el que actúa, y el efecto que desencadena.

En situaciones de hambre, se sintetiza un tipo de cannabinoide endógeno específico, la anandamida, que actúa sobre un receptor concreto, el CB1. Estos receptores están localizados en unas determinadas terminales nerviosas en el bulbo olfatorio, cuya función es regular la transmisión sináptica excitadora.

Cuando los cannabinoides actúan sobre estos receptores CB1 del bulbo, se da una reducción de la comunicación excitadora procedente de zonas olfatorias de la corteza cerebral, y que termina en la capa más interna del bulbo olfatorio. Como consecuencia de ello, todas las funciones intrínsecas a nivel del bulbo olfatorio se ven favorecidas. Así, por ejemplo, las células que captan el olor transmiten mejor y, por tanto, la percepción del olfato es mayor.

≪ En situaciones de hambre, se sintetiza un tipo de cannabinoide endógeno específico, la anandamida, que actúa sobre el receptor Cb1 del bulbo olfatorio encargado de estimular la percepción olfativa en estados de ayuno ≫

Inicialmente se determinó la distribución del receptor CB1 en el cerebro. Posteriormente, se realizó la caracterización de la función del receptor CB1 en los mecanismos descritos, es decir, en condiciones de hambre, en la percepción del olfato, y en la ingesta de comida.

"Vimos que el receptor CB1 es necesario en estos mecanismos, ya que si era bloqueado farmacológicamente, o se eliminaba genéticamente, los ratones comían menos en situaciones de hambre", ha detallado Grandes.

Más adelante, corroboraron esta función del receptor CB1 en ratones que no tenían este receptor, pero a los que habían hecho expresar el mismo mediante manipulaciones genéticas.

"En esos experimentos se vio que estos ratones volvían a comer más al tener receptores CB1 en la vía neuronal descrita, que proyecta de la corteza cerebral al bulbo olfatorio", ha explicado.

Asimismo, mediante estudios realizados *in vivo*, se confirmó el papel del receptor CB1 en el mecanismo que lleva al ratón a una mayor ingesta.

Por último, los investigadores pudieron observar que estos fenómenos no son desencadenados sólo por los cannabinoides endógenos.

La traslación del presente estudio al ámbito clínico podría dar lugar a la generación de nuevos fármacos que fueran útiles para el tratamiento de determinados trastornos de la alimentación.

"En personas que presentan una anorexia podríamos estimular la ingesta, favoreciendo estos mecanismos. Y por el contrario, en casos de obesidad, el objetivo sería intentar reducir la función de estos receptores CB1, para reducir la percepción del olor y así conseguir que estos individuos comieran menos en situaciones de hambre."

http://www.infosalus.com/nutricion/noticia-descubren-mecanismo-cerebral-conecta-olfato-apetito-20140210104540.html

E. Soria-Gómez, L. Bellocchio, L. Reguero, G. Lepousez, C.Martin, *et al.* ***The endocannabinoid system controls food intake via olfactory processes.*** Nature Neuroscience 2014, 17(3): 407-18.

Reprogramación de células somáticas de mamíferos mediante estrés ambiental

Un grupo de investigadores japoneses ha diseñado una técnica para inducir pluripotencia a las células somáticas que conforman el crecimiento de los tejidos y órganos, presentes en la mayoría de las células de un organismo pluricelular.

La revista *Nature* publica dos artículos que describen una forma de reprogramación inusual que altera el destino de las células somáticas, mediante un método sorprendentemente simple, la exposición al estrés (como la disminución del pH del medio), con el que se obtienen, de un modo más rápido y eficiente, células aún más maleables que las células madre pluripotentes inducidas (CMPI).

≪ Reprogramación inusual que altera el destino de las células somáticas, mediante la exposición al estrés, con el que se obtienen células aún más maleables que las células madre pluripotentes inducidas (CMPI) ≫

Probaron si las células somáticas posnatales de ratón podían someterse a la reprogramación nuclear simplemente en respuesta a desencadenantes externos sin manipulación directa nuclear haciéndolas evolucionar a un estado pluripotente, desde el que son capaces de diferenciarse en casi todos los tipos de células del organismo. Lo lograron tras exponerlas a estrés ambiental, en este caso, una corta exposición a un pH ácido, ya que la embriología experimental clásica ha demostrado que un tratamiento transitorio de bajo pH en condiciones subletales puede alterar el estado de diferenciación de los tejidos. Este fenómeno ha sido denominado "Adquisición de estímulo-desencadenador de la pluripotencia" (STAP, por sus siglas en inglés).

Para que pudieran calificarse de pluripotentes, las células debían demostrar que podían convertirse en todos los tipos celulares. Para ello las introdujeron en embriones de ratón, añadiéndoles genes fluorescentes para comprobar si se diferenciaban en los distintos tejidos de un ser vivo. Si las células eran pluripotentes, se observaría fluorescencia en todos los tejidos del ratón, como así sucedió.

En un segundo trabajo, investigaron la naturaleza de las células STAP y concluyeron que representan un estado único de pluripotencia. También demostraron que bajo condiciones de cultivo de células madre pluripotentes, las STAP se pueden transformar en una "forma robusta" de células madre autorrenovadas, similares a las células madre embrionarias. Además, las células reprogramadas mediante STAP también pueden formar el tejido placentario, algo que ni las CMPI ni las células madre embrionarias pueden hacer.

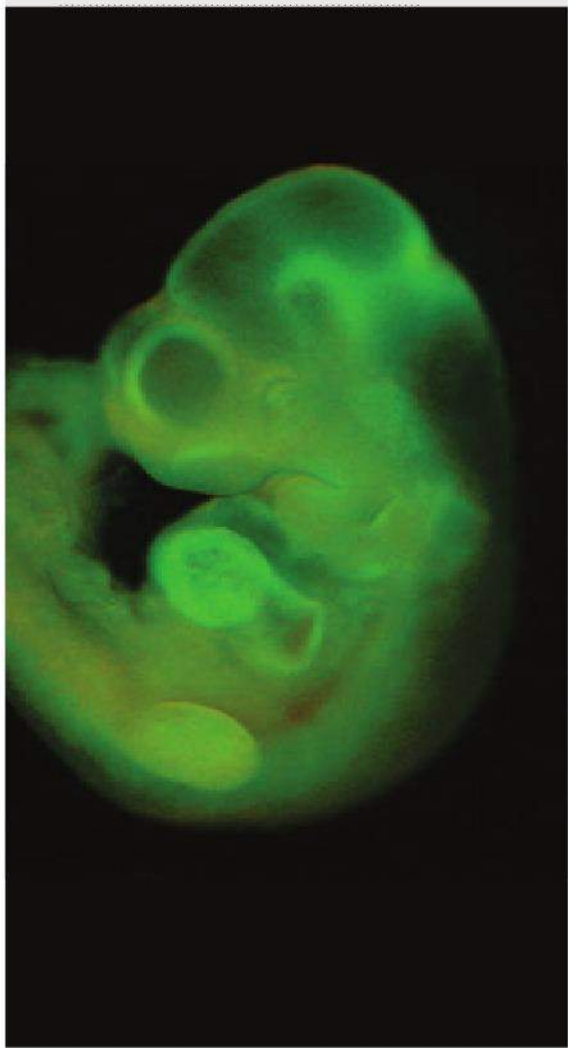
Este es un fenómeno de reprogramación celular único que no requiere ni la transferencia nuclear, ni la introducción de factores de transcripción, y que supone implicaciones importantes para la medicina regenerativa.

http://www.agenciasinc.es/Noticias/Logran-obtener-celulas-pluripotentes-en-mamiferos-mediante-estres-ambiental

http://www.investigacionyciencia.es/noticias/un-camino-ms-fcil-para-obtener-clulas-madre-11794

H. Obokata, T. Wakayama, Y. Sasai, K. Kojima, M.P. Vacanti, *et al.* ***Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency.*** Nature 2014, 505: 641-47.

H. Obokata, Y. Sasai, H.Niwa, M. Kadota, M. Andrabi, *et al.* ***Bidirectional developmental potential in reprogrammed cells with acquired pluripotency.*** Nature 2014, 505: 676-80.



Tan cerca como ellos, del personal del animalario.

Anúnciese en ANIMALES DE LABORATORIO,
la revista en habla hispana más importante del sector
y posicione sus productos directamente
en manos de los animalarios.

Foto Shutterstock

SECAL
sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

www.secal.es

ANIMALES DE LABORATORIO
Primavera 2014. Número 61

Células Madre. Introducción

Mª Belén Pintado
Unidad de Transgénesis CNB-CBMSO. Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Los últimos 50 años han sido testigo de una auténtica revolución en nuestro conocimiento de los mecanismos que explican el funcionamiento de las células. Se ha llegado hasta el punto de plantear la posibilidad de crear vida artificial. En este contexto merece especial atención una serie de descubrimientos que han permitido entender los mecanismos de la diferenciación celular y la posibilidad de revertirlos. El resultado fue el descubrimiento y caracterización de las células madre, también llamadas células troncales o células *stem*, cuando se utiliza el término inglés. A lo largo de una serie de artículos recogidos en esta monografía, veremos en detalle no sólo lo que son las células madre, sino el potencial que representan para ofrecer respuestas a uno de los anhelos más antiguos del ser humano, la inmortalidad.

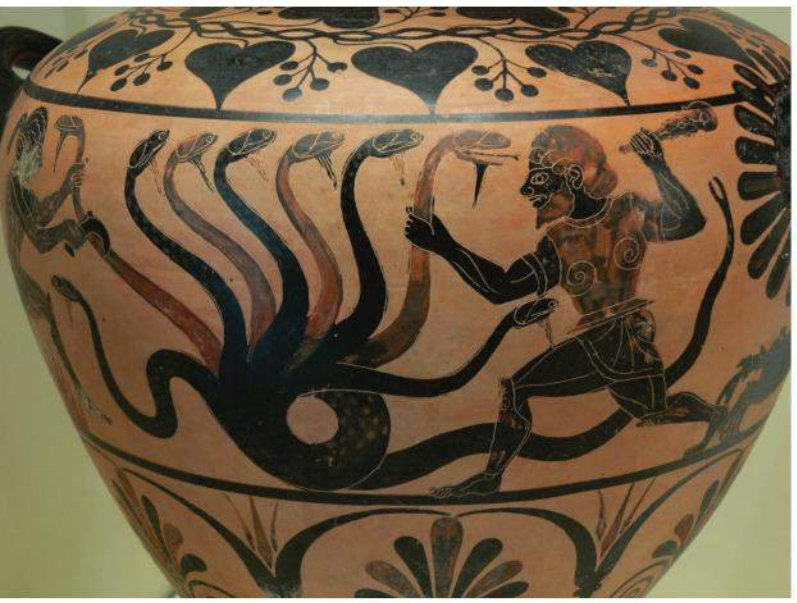


Figura 1.- Heracles y la hidra de Lerna.

El deseo de la regeneración, representada en su máxima expresión en el ave fénix, se ha reflejado de forma constante en todas las culturas y la nuestra no ha sido una excepción. Mitos como la lucha de Heracles con la Hidra de Lerna (ver Figura 1), o novelas como "El retrato de Dorian Grey", e incluso la organización de expediciones en busca de la fuente de la eterna juventud son una muestra del deseo intrínseco del ser humano de vencer al envejecimiento y a la muerte. Hoy en día y por primera vez, la ciencia está en el camino de ofrecer un sistema real para la regeneración de órganos o tejidos, cuyo funcionamiento defectuoso compromete nuestra supervivencia.

De los renacuajos a Dolly: la clonación como herramienta para el descubrimiento de las células madre

Esta introducción pretende recorrer una serie de avances científicos que, directa o indirectamente relacionados con las células madre, sentaron las bases para alcanzar el nivel de conocimiento necesario. El primer paso fue el resultado de una serie de trabajos de dos investigadores americanos, Robert Briggs y Thomas King que a principios de la década de los cincuenta pusieron a punto un sistema de transferencia nuclear en ranas leopardo. La técnica consistía en la activación de un ovocito sin fecundar, mediante el pinchazo con una aguja de cristal. Este proceso permitía, por un lado, eliminar el núcleo haploide de este ovocito, es decir, prescindir de la información genética de la hembra, y sustituirlo por otro núcleo diploide extraído de una célula procedente de un embrión en fases muy tempranas de desarrollo. El nuevo individuo era un clon, o lo que es lo mismo, una copia genética del embrión cuya célula se había utilizado como donante del núcleo. De allí surgió el nombre de esta tecnología, la clonación. Por primera vez se lograba desarrollar en un vertebrado una técnica reproductiva que hasta entonces se había descrito sólo en plantas y de la que tomó el nombre. Clon en griego quiere decir "retoño".

Briggs y King estudiaron durante años el potencial de diferentes células para actuar como donantes de núcleos y observaron que cuanto más avanzado estaba el desarrollo del embrión donante, más difícil era lograr un clon viable. Estos experimentos sirvieron para sentar la base científica de una teoría ampliamente aceptada: la capacidad de las células para dar lugar a un nuevo individuo se perdía conforme se iban diferenciando y ese momento de no retorno se alcanzaba relativamente pronto durante el desarrollo embrionario.

Sin embargo Thomas Gurdon no compartía esta visión y en 1958, utilizando otro modelo de anfibio, el *Xenopus laevis*, demostró que era posible obtener clones, vivos y fértiles, utilizando células de fases mucho más avanzadas en el desarrollo

que las utilizadas por Briggs y King. Además, los clones obtenidos eran perfectamente capaces de reproducirse una vez llegados a la edad adulta. Sus experimentos posteriores fueron muy controvertidos, especialmente cuando anunció en 1977 la clonación de anfibios a partir de núcleos de células intestinales de un adulto. Fueron necesarios muchos años para que la comunidad científica aceptara plenamente el valor de su contribución.

Muy lejos del concepto actual, durante los años 70 y 80, la clonación se entendió como una prueba extraordinariamente rigurosa del potencial de la información que residía en el núcleo de una célula. En otras palabras, daba el veredicto final sobre en qué momento del desarrollo, las células perdían esa capacidad del cigoto de dar lugar a un individuo completo a partir de una única célula. En estas décadas se dedicó un esfuerzo considerable para adaptar los descubrimientos realizados en anfibios a mamíferos. Un investigador brilla con luz propia en este campo, el danés Steen Willadsen, que después de un breve tiempo dedicado a la práctica veterinaria, se incorporó a la Unidad de Fisiología Reproductiva del British Agricultural Research Council en Cambridge. Inicialmente centró su trabajo en la puesta a punto de sistemas de congelación y manipulación de embriones de ovino y bovino. Willadsen fue el primero en lograr gemelos idénticos de ovejas, cabras, vacas y caballos mediante la división mecánica de embriones en fase de 2 y 4 células, demostrando que la mitad de las células mantenían la capacidad de generar un individuo completo.

Dando un paso más, y en colaboración con la embrióloga Carole Fehilly, desarrolló quimeras de oveja y cabra. Inicialmente agregaron células de distintos embriones de la misma especie y más tarde llegaron incluso a combinar células de estas dos especies y de oveja y vaca logrando la gestación de animales viables. Willadsen trató de discernir cuál era el destino de las células en la primera diferenciación celular que tiene lugar en el embrión, aquella por la que se decide cuál de las células embrionarias dará lugar a las células que formarán el trofoblasto y posteriormente la placenta, y cuál de las células contribuirá al embrión. De esta forma fue capaz de "reconstruir" embriones que permitían producir una quimera en la que el embrión era de una especie pero los tejidos placentarios eran de otra y, por lo tanto, podían llevar la gestación a término de una especie en otra. Algo diferente a las gestaciones de híbridos entre dos especies, como es el caso del mulo.

En 1984, Willadsen clona por primera vez una oveja partiendo de núcleos de células embrionarias (blastómeros), de embriones hasta la fase de 8 células. Solo un año después repite el proceso clonando una vaca de alto valor genético. Para entonces ya trabajaba para la empresa Grenada Genetics. En 1986, dando un paso más, logra clonar una vaca utilizando el núcleo de células embrionarias mucho más diferenciadas que en sus experimentos anteriores. Nunca llegó a publicar oficialmente esos resultados, pero de alguna manera influyó de manera determinante en el mayor hito de la clonación, el nacimiento de Dolly. Crucial para este proyecto fue que Ian Wilmut, su director, contara en su equipo con Keith Cambell quien con anterioridad había publicado junto a Bill Ritchie el nacimiento de dos corderos, Megan y Morag, obtenidos de células embrionarias que se habían diferenciado en cultivo.

Reconocido por el propio Ian Wilmut, Keith Cambell fue quien contribuyó en mayor medida al nacimiento de Dolly y apoyando las ideas de Thomas Gurdon, puso en evidencia la falsedad de uno de los dogmas que se habían defendido de manera generalizada hasta entonces, la imposibilidad de que una célula adulta diferenciada fuera capaz de dar lugar a un clon viable. Dolly fue la demostración práctica y de alguna manera inició una línea de investigación que cristalizó en última instancia en definir qué factores eran los determinantes para lograr esta desdiferenciación y reprogramación de las células adultas hacia la pluripotencia. En 2005, el Dr. Shinya Yamanaka culmina esta línea con el descubrimiento del mecanismo para producir las células adultas pluripotentes inducidas (iPS), y el Premio Nobel de Medicina o Fisiología de 2012, compartido con el Dr. Gurdon, *por el descubrimiento de que las células maduras pueden ser convertidas en células madre*, distingue este hecho. No pocos echaron en falta el nombre de Keith Campbell compartiendo este reconocimiento.

Totipotencia, pluripotencia y multipotencia

Al hablar de células madre y como se verá en los siguientes artículos, se mencionan frecuentemente los conceptos de totipotencia, pluripotencia y multipotencia. Todos ellos hacen referencia a la plasticidad de las células, es decir, su capacidad de convertirse en diferentes tejidos. La célula totipotente por excelencia es el cigoto. Esa fase del desarrollo embrionario cuenta con una única célula formada a partir de la unión de los gametos femenino y masculino en el proceso de la fecundación. El cigoto es totipotente, ya que a partir de esta única célula se desarrollarán todas las que constituyen un individuo adulto y diferenciado. La "totipotencia" se conserva brevemente durante los primeros 2-3 ciclos de división celular en los que los embriones pasan a tener 2, 4 y 8 células (ver Figura 2). En esas fases es posible obtener de cada célula o "blastómero" un nuevo individuo genéticamente idéntico a los procedentes de los otros blastómeros que constituían el embrión.

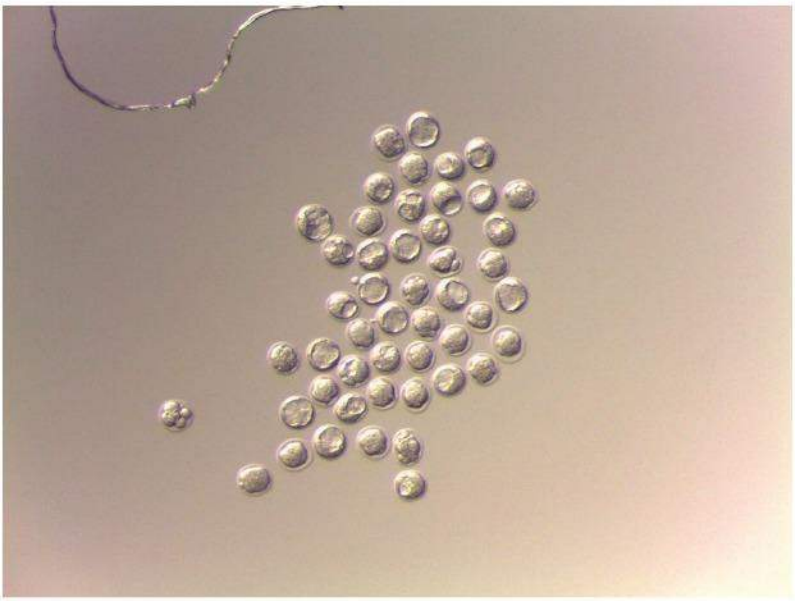


Figura 2.- Embriones de ratón en distintas fases de desarrollo.

Sin embargo, unas pocas divisiones más hacen perder esta capacidad y las células pasan a ser "pluripotentes". El embrión experimenta la primera diferenciación visible morfológicamente, algunas células pasan a formar el trofoblasto y otras la masa celular interna. Sólo estas últimas conservan un potencial de diferenciación en los diferentes órganos o tejidos que se conoce como "pluripotencia". Estas células pluripotentes son las células madre embrionarias (ESC). Como se verá más adelante en la monografía, las células madre embrionarias de ratón han sido una de las herramientas más importantes para los estudios del funcionamiento y estructura del genoma. A través de la mutagénesis dirigida, han permitido obtener animales a los que se inactiva un gen específico (*Knock-out*) o se les sustituye una secuencia endógena por otra diferente (*Knock-in*).

Con un potencial semejante pero un origen muy distinto están las células de carcinoma embrionario o células EC, que fueron aisladas y establecidas en cultivo en 1975 por Gail Martin y Martin Evans. Se trata de unas células pluripotentes presentes en teratocarcinomas, tumores muy complejos que se desarrollan en las gónadas fundamentalmente en testículos. Las células EC tienen una aplicación muy limitada ya que en la gran mayoría de los casos muestran una gran inestabilidad cromosómica. Con mucha frecuencia se observa una pérdida o ganancia de cromosomas y una expresión aberrante de genes. La gran contribución de las células EC fue el establecer las bases necesarias para que en 1981 Evans y Kaufman por un lado y Martin por otro aislaran las células madre embrionarias.

En Biología se entiende por pluripotencia la capacidad de una célula madre de diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales: endodermo, mesodermo o ectodermo. Las células madre embrionarias tienen esta capacidad, pero también es posible inducir esta pluripotencia en células adultas. Son las conocidas como células iPS. Este proceso se consigue forzando la expresión de una serie de genes y factores de transcripción y, como se verá en los capítulos específicos, abren numerosas vías para el tratamiento de enfermedades, la regeneración de tejidos o incluso la recuperación de especies animales en peligro de extinción. El descubrimiento de estos factores de transcripción: *Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc*, primero en fibroblastos de ratón y luego aplicados a fibroblastos humanos fue la gran contribución del Dr. Yamanaka. Por primera vez era posible obtener células madre humanas sin tener que recurrir a la destrucción de un embrión para ello. Hasta ese momento, las células madre humanas habían procedido siempre de embriones y a pesar de su enorme potencial terapéutico, su utilización había estado limitada por problemas éticos.

Hasta 2006, y precisamente por estos problemas éticos, muchos investigadores centraron su atención en tratar de localizar en los organismos adultos algunas células que hubieran conservado esa capacidad de autoreplicación e indiferenciación. Merced a estos estudios se identificaron las células madre adultas. Estas células en particular contaban con un grado de plasticidad menor que las células embrionarias hablándose en su caso de una "multipotencia". Un ejemplo típico de estas células son aquellas células progenitoras hematopoyéticas que son capaces de dar lugar a distintos tipos celulares, pero muy próximos entre sí. Se han localizado células de estas características en el tejido adiposo, las células cardíacas, la médula ósea y en el cordón umbilical.

La pluripotencia no solo está presente en las células de carcinoma embrionario (EC), las células madre embrionarias (ESC) o las células adultas pluripotentes inducidas (iPS). Hay al menos otra población celular con esta característica, las células troncales germinales, que se obtienen de las células indiferenciadas que dan lugar a las células germinales, espermatogonias y ovocitos y que precisamente por esta razón, deben de conservar unas características de indiferenciación muy especiales. Un cigoto, la célula totipotente por excelencia, resulta de la fusión de dos gametos, que a su vez proceden de las líneas germinales masculina y femenina alojadas en las gónadas y, por esa razón, las células germinales tienen unas características especiales que las hacen ser capaces de recuperar la totipotencia. Estas células tienen un potencial especial para tratar disfunciones reproductivas o la conservación de especies.

Tipos de células madre

Para terminar esta introducción es conveniente recopilar los diferentes tipos de células madre o troncales a las que se referirán los siguientes capítulos. Todas ellas comparten unas características comunes, su capacidad de derivar indistintamente hacia diferentes tejidos y su inmortalidad. Entendiendo esta última como su capacidad de sobrevivir en cultivo *in vitro* un gran número de generaciones manteniendo ese estado indiferenciado que las caracteriza. Sin embargo, como hemos visto, esta plasticidad no es igual en todos los casos. Según el origen podemos agruparlos en dos tipos:

a) Células madre de origen embrionario

Las células madre embrionarias (ESC) proceden de la masa celular interna del embrión en fase de blastocisto. Se obtienen precisamente cultivando ésta en unas condiciones específicas que aseguran su inmortalidad y pluripotencia.

Las células teratocarcinoma-embrionarias o EC procedentes de tumores desarrollados en fetos tempranos que aparecen de forma natural o que se inducen experimentalmente.

Las células troncales germinales que se derivan de las células germinales primordiales o PGCs que de forma natural son el origen de las células germinales masculinas, las espermatogonias o femeninas oogonias.

b) Células madre de origen adulto

Células madre adultas son aquellas células madre localizadas de forma natural en diferentes tejidos y que actúan como repositorio natural de las células que se renuevan en el organismo adulto, como es el caso de las células sanguíneas.

Células madre inducidas o iPS son células adultas cuya diferenciación se revierte mediante el uso de diferentes estrategias.

En todos los casos, y como veremos en el último capítulo, las líneas pluripotentes generadas y mantenidas en el laboratorio no conservan o recuperan la totalidad de las características de las células totipotentes. Durante el proceso en el que son establecidas se alteran algunos equilibrios sutiles que aún desconocemos. La desdiferenciación supone un riesgo y tiene un precio, como veremos en el último capítulo. Nuestros conocimientos, aún a pesar de su enorme avance, no han sido capaces de equipararse a la Naturaleza.

ANIMALES DE LABORATORIO
Primavera 2014. Número 61

Células madre embrionarias en ratón: Técnicas y aplicaciones

Verónica Domínguez Plaza
Unidad de Transgénesis CNB-CBMSO. Campus de Excelencia CSIC-UAM

Introducción: ¿Qué son las células madre embrionarias de ratón?

Las células madre embrionarias (ES o ESCs) provienen de embriones de ratón en estadios preimplantacionales, concretamente de blastocistos, en los que ya ha tenido lugar el primer paso de la diferenciación en el desarrollo embrionario de los mamíferos. Los células del blastocisto empiezan a organizarse y diferenciarse en tres tipos celulares distintos (ver Figura 1) que darán lugar a las tres capas germinales: las células más externas del blastocisto se denominan trofoectodermo, son células epiteliales y darán lugar a la placenta y tejidos extraembrionarios; las células que quedan dentro del trofoectodermo se denominan masa celular interna (ICM) y está compuesta por dos poblaciones celulares, las más externas o hipoblasto forman el endodermo primitivo y las más internas o epiblasto, el ectodermo primitivo. Las células ES provienen de esta tercera población celular y mantienen dos características de sus progenitoras: son capaces de diferenciarse en todos los linajes celulares posteriores a este estadio del desarrollo del ratón (**pluripotencia**) y sobre todo son capaces de multiplicarse y dar lugar a nuevas células ES, con las mismas capacidades de desarrollo y diferenciación que sus progenitoras (**autorrenovación**). Estas características las convierten en una poderosa herramienta, ya que cualquier modificación genética que efectuemos sobre ellas podrá dar lugar a un organismo completo, un ratón en nuestro caso, en el cual todas sus células porten dicha modificación, incluidas las células germinales, por lo que la modificación genética podrá ser transmitida a la descendencia (transmisión a línea germinal) y generar una población de ratones con la mutación introducida en las células ES.

Otra característica importante es que prácticamente sólo existen *in vitro*, ya que las células madre embrionarias de ratón *in vivo* tienen una breve existencia, el tiempo que tarda el blastocisto en empezar a diferenciarse para formar los distintos tipos celulares y tejidos del ratón, y no existen en ninguna parte del organismo adulto, aunque recientemente un grupo español ha conseguido que células adultas de un ratón vivo retrocedan en su desarrollo evolutivo hasta recuperar características propias de células madre embrionarias [1].

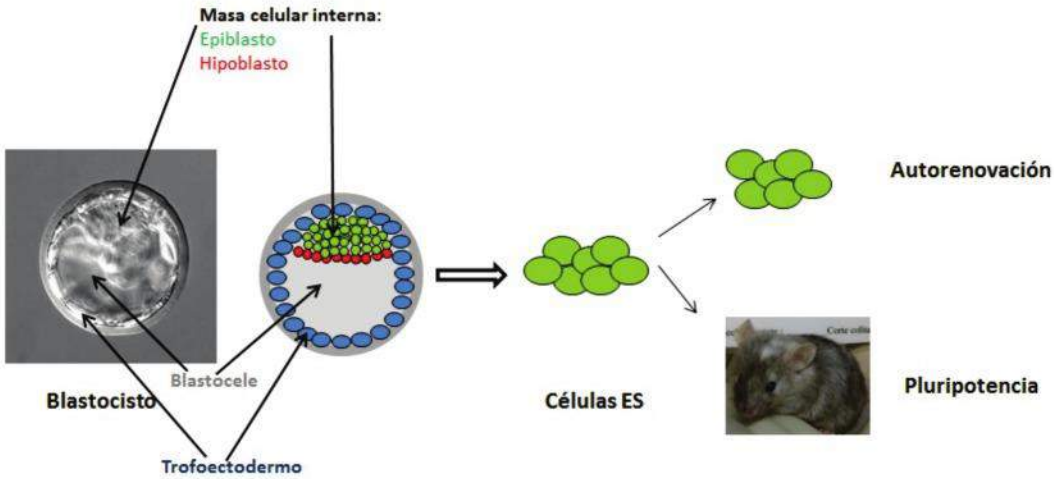


Figura 1.- Características de las células madre embrionarias de ratón.

Historia de un premio Nobel

En el año 2007, Mario R. Capecchi, Martin J. Evans y Oliver Smithies recibieron el premio Nobel de Medicina o Fisiología por *"sus descubrimientos para introducir modificaciones específicas en ratón utilizando células madre embrionarias"* (ver Figura 2). Los trabajos que dieron lugar a este premio comenzaron 26 años antes con la publicación en 1981 de dos artículos sobre el establecimiento de líneas de células ES de ratón en unas condiciones específicas de cultivo, en las que se inhibía su diferenciación y se inducía su autorrenovación [2,3]. Modificándose sus condiciones de cultivo *in vitro*, estas células ES fueron capaces de diferenciarse en varios tipos celulares, y también *in vivo*, al ser inyectadas en blastocistos de ratón, demostrándose así su pluripotencia. En los experimentos *in vivo* se obtenían ratones quiméricos, en los cuales, además de células del blastocisto receptor, se encontraban células derivadas de las ES en todos los linajes celulares somáticos. Hubo que esperar tres años más para que Alan Bradley demostrara en 1984 la contribución a la línea germinal [4].

Pero el hito más importante se produjo en 1986 cuando dos grupos distintos reportaron que se habían generado ratones modificados genéticamente a partir de células ES cuyo genoma previamente se había mutado, y lo más importante, dicha mutación se transmitía a la línea germinal, obteniéndose ratones con la misma mutación introducida en las células ES en todos sus linajes celulares [6,7]. Paralelamente Smithies, el tercer laureado, publicó la técnica de la recombinación homóloga en células eucariotas [8], que más tarde permitiría la mutación dirigida (*targeting* en inglés) de secuencias específicas de cualquier gen de ratón. Estos trabajos y descubrimientos fueron el comienzo de una auténtica revolución del conocimiento de la genética del ratón y abrieron las puertas a la generación de ratones *knock-out* (KO) [9, 10].

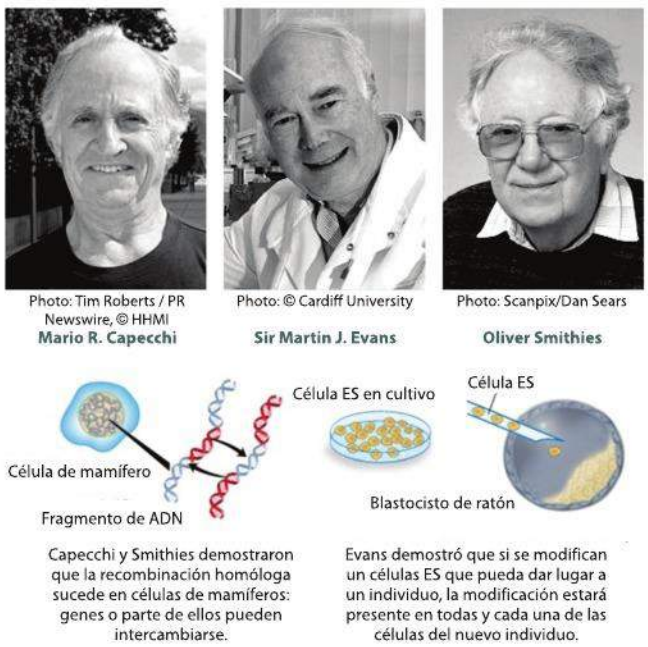


Figura 2.- Premio nobel de medicina o fisiología 2007 [5].

Desde los años 90 hasta ahora, el ritmo ha sido vertiginoso y hoy en día existen consorcios internaciones [11] que dedican sus esfuerzos a generar un banco de células ES modificadas genéticamente que permita a los investigadores inactivar los más de 20.000 genes que forman el genoma del ratón (International Mouse Phenotyping Consortium, http://www.mousephenotype.org/).

Generación de células ES

Aunque las primeras células ES de ratón se generaron en los años 80, la investigación sobre las condiciones de cultivo óptimas, la inhibición de la diferenciación, y la transmisión de éstas a línea germinal cuando son utilizadas para generar ratones modificados genéticamente, sigue abierta y avanzando continuamente. El éxito varía en función de la experiencia del equipo que lo lleve a cabo y de la calidad de los reactivos que se utilicen. Actualmente los esfuerzos están encaminados a la sustitución de los medios no definidos, basados en suero fetal bovino (SFB o FCS) por medios más definidos [12], en los que se puedan eliminar variabilidades entre diferentes lotes del mismo reactivo, y el uso de lo que denominamos pequeñas moléculas o citoquinas, que inhiben distintas rutas clave de la diferenciación natural de las células ES [13]. Estas investigaciones han hecho posible que hoy seamos capaces de generar y mantener en cultivo células madre embrionarias de cualquier fondo genético, incluyendo los menos permisivos C56Bl/6, FVB, CBA, NOD... de modo que existe la posibilidad de generar animales con cualquier mutación y en cualquier fondo genético. Las posibilidades que aportan a la investigación que implica generación de ratones modificados genéticamente son infinitas. La utilización de estos medios definidos también facilita trabajar con células ES de peor calidad, generadas con técnicas más antiguas, aumentando así las posibilidades de generar ratones a partir de ellas; es el caso de las células generadas en fondo C57Bl/6 y utilizadas ampliamente por los científicos y los consorcios internacionales [14].

Como ya se ha explicado se parte de embriones de ratón de 3.5 dpc (días post coito), que pueden provenir de hembras superovuladas o de cruces naturales; en caso de la primera opción se obtienen más embriones pero de menor calidad que en la segunda, que es la que suele elegirse si la prolificidad de la cepa con la que trabajamos es buena. En este momento los embriones están en el útero, desde el que se recolectan en estadio de blastocisto. También se puede partir de embriones en fases anteriores de desarrollo y cultivarlos *in vitro*. De hecho a partir de 2008 empezaron a aparecer trabajos en los que el porcentaje de éxito en la generación de ES, sobre todo con fondos genéticos no permisivos, se elevaba sustancialmente partiendo de embriones en fase de mórula (ver Figura 3A), y cultivándolos hasta el estadio de blastocisto (ver Figura 3B) en un medio de cultivo suplementado con dos o tres pequeñas moléculas inhibidoras de rutas implicadas en procesos de diferenciación (ERK quinasas y GS3K) [13]. Además de facilitar y aumentar el éxito y la calidad en la generación de células ES, se disminuye el número de animales necesarios para los experimentos, garantizándose el cumplimiento de las 3Rs [15]. Poco a poco se va implementando este sistema (que se suele denominar 2i, haciendo mención a las dos moléculas inhibidoras de las rutas de diferenciación mencionadas) en la mayoría de los centros en los que se generan ES de ratón y/u otras especies. La utilización del sistema 2i impide que en el proceso de formación de la masa celular interna del blastocisto se forme el hipoblasto (la capa más externa), y esté formada exclusivamente por células de epiblasto (ver Figura 1). Este hecho y el mantenimiento de los 2i en cultivo hasta que las células ES están establecidas es lo que determina que se haya incrementado tanto el porcentaje de éxito. Además de 2i, se tiende a usar medios de cultivo cada vez más definidos, sustituyendo el suero fetal bovino por otras formulaciones (p. ej. SR, *serum replacement* en inglés); otro factor imprescindible es el LIF (factor inhibidor de leucemia) implicado también en la inhibición de rutas de diferenciación. Hoy en día es fácil encontrar y comprar medios completos de varias casas comerciales que cumplen estos requisitos. En los distintos protocolos suele aparecer también la utilización de monocapas de MEFs (fibroblastos murinos inactivados) en el cultivo (ver Figura 3D), que se utilizan por dos motivos: uno, son fuente endógena de LIF y otros factores de crecimiento y dos, hacen que debido a su adherencia natural sea más fácil mantener al embrión pegado a la placa de cultivo, una vez fuera de la zona pelúcida, y posteriormente a las células ES, lo que facilita el trabajo con ambos.

El primer paso es la obtención de los embriones, en nuestro caso y según el sistema de 2i, en 2.5 dpc, es decir mórulas (ver Figura 3A) y cultivarlos en un medio de cultivo de embriones (p. ej. KSOM) suplementado con los 2i, durante dos o tres días, tras los cuales los embriones comienzan a salir de la zona pelúcida, lo que se conoce como eclosión o *hatching* en inglés (ver Figura 3C); *in vivo* es la fase previa a la implantación, e *in vitro* sucede si las condiciones de cultivo son óptimas. En esta fase los embriones son muy frágiles y la destreza para su manejo es imprescindible. Hay investigadores que prefieren separar la masa celular interna del trofoblasto y poner en cultivo sólo la primera, aunque la técnica es compleja y dañina para el embrión, y no es imprescindible, por lo que sólo si se tiene la experiencia necesaria es conveniente realizarla. Si la eclosión del embrión no sucede de forma natural puede realizarse en el laboratorio, sometiendo a los embriones a un baño con solución tyrode, que degrada la zona pelúcida.

El siguiente paso es poner en cultivo el embrión eclosionado, o la masa celular interna, con un medio de cultivo adecuado para las células ES (ver Figura 3E). Puede ser un medio definido, con inhibidores y LIF, y en ausencia o presencia de MEFs, o un medio más tradicional, con suero fetal bovino de calidad, LIF y MEFs; dependerá de la experiencia del grupo, la permisividad del fondo genético y de la aplicación que queramos dar a las células ES. Las placas de cultivos se sitúan en incubadores con temperatura y concentración de CO_2 controladas, generalmente 37ºC, 5% de CO_2 y 95% de humedad.

En los siguientes días el embrión se adhiere a la monocapa de MEFs, o a la placa de cultivo recubierta de alguna sustancia que aumente su adhesión (p. ej. gelatina), y las células de la masa celular interna empiezan a proliferar hasta formar una colonia de células de un tamaño suficiente para ser disgregado (ver Figura 3F-G). La disgregación se realiza con métodos enzimáticos (tripsina o acutasa) y la elección de este momento es crítica; si se hace muy pronto y hay pocas células éstas morirán al individualizarse, si es demasiado tarde las células más internas, y menos expuestas por lo tanto al medio de cultivo, habrán empezado su diferenciación, por lo que no podremos obtener células ES pluripotentes.

Tras esta primera disgregación, el cultivo empieza a crecer más lentamente y empiezan a aparecer las primeras colonias de células ES si todo ha ido bien (ver Figura 3H-I). El cultivo se expande y se congela lo antes posible ya que en el trabajo con células ES, sobre todo para generar ratones, es importante trabajar con pases tempranos. Tiempos largos de cultivo hacen que aumente la posibilidad de que aparezcan anomalías cromosómicas (las más típicas son la trisomía del cromosoma 8 o la pérdida del cromosoma Y), pequeñas mutaciones y metilaciones que pueden inactivar algunos genes.

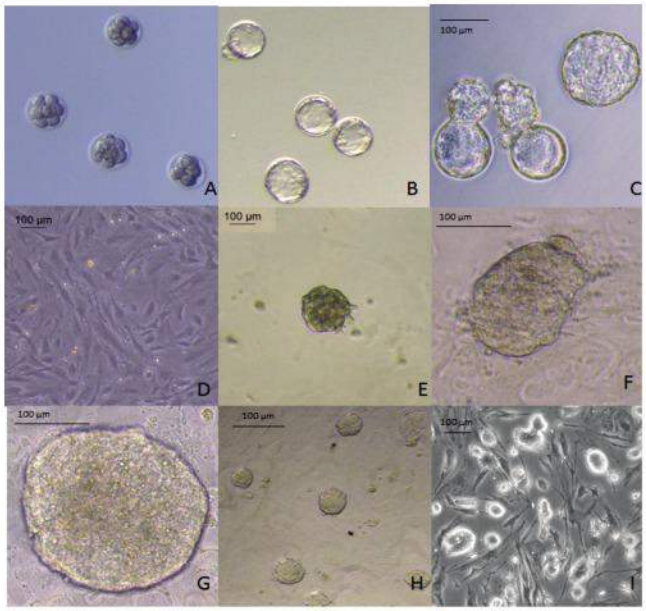


Figura 3.- Pasos en la generación de células ES. **A)** Embriones en fase de mórula. **B)** Embriones en estado de blastocisto. **C)** *Hatching* o eclosión de los embriones. **D)** Capa de fibroblastos embrionarios murinos. **E)** Masa celular interna en cultivo. **F)** Proliferación de la masa celular interna en cultivo 48h. **G)** Proliferación de la masa celular en cultivo 96h. **H)** Células ES 24h después de la disgregación de la ICM. **I)** Cultivo de células ES establecidas.

Caracterización de las células ES

Cada línea de células ES procede de un único embrión. Generalmente cada vez que queramos generar células ES de un determinado fondo genético, o de una determinada cepa de ratones con una mutación concreta que nos interese, tendremos varias líneas, tantas como embriones hayan logrado sobrevivir a la generación. A los test y protocolos que efectuamos para llegar a elegir la o las mejores se los denomina caracterización.

El primer criterio es morfológico, los cultivos crecen bien (haciendo pases 1:6-1:8 el cultivo llega a subconfluencia en dos días), con colonias con buena morfología, redondeadas, refringentes y sin indicios de diferenciación (ver Figura 4).

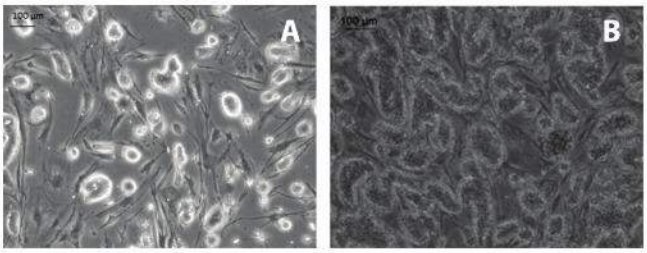
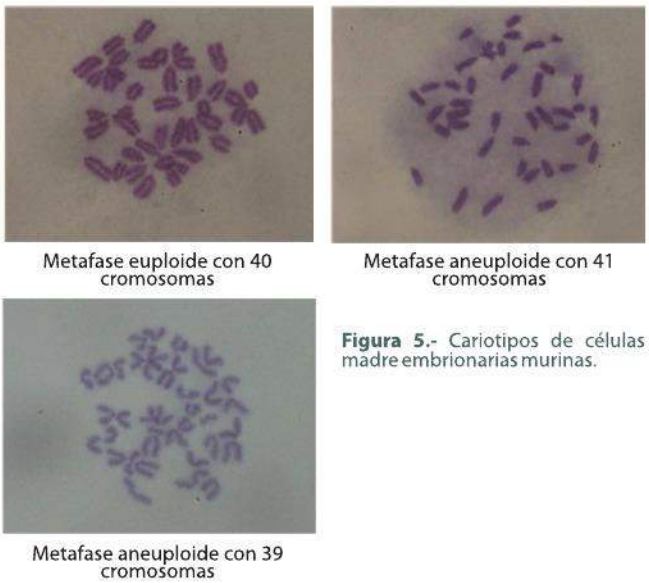


Figura 4.- A) Células ES con buena morfología. **B)** Células ES diferenciadas.

El siguiente paso es la realización de un test de patógenos que nos asegure que nuestro cultivo está libre de contaminación de agentes que pongan en peligro nuestra investigación o el estatus sanitario del animalario en el que vamos a utilizarlas; un ejemplo común de contaminaciones y problemas en los laboratorios de células ES es el micoplasma.

Las células madre embrionarias se caracterizan por la expresión diferencial de tres genes (*oct4, ssea-1 y nanog*), que pueden utilizarse como marcadores para caracterizar los cultivos obtenidos como células ES.

Las células ES en cultivo deben mantener su euploidia, es decir, no acumular anomalías y/o translocaciones cromosómicas que pueden ser las responsables de que las células no generen quimeras, o si las generan, que éstas no sean capaces de contribuir a la línea germinal de los ratones. Para asegurar la euploidia podemos utilizar diferentes técnicas, una de ellas es la realización de un cariotipo (ver Figura 5). Si las células van a utilizarse para la generación de ratones, es importante asegurarnos de que sean XY, así las quimeras obtenidas son machos, y la generación de los animales cruzando es más rápida y, por lo tanto, más barata.



Metafase euploide con 40 cromosomas

Metafase aneuploide con 41 cromosomas

Metafase aneuploide con 39 cromosomas

Figura 5.- Cariotipos de células madre embrionarias murinas.

Por último hay que valorar la potencia o pluripotencia de nuestras células. Si vamos a usarlas para experimentos *in vitro* y no vamos a generar ratones, podemos llevar a cabo distintos ensayos de diferenciación, en los que si las células son pluripotentes, serán capaces de diferenciarse en determinados tipos celulares en función del medio de cultivo específico en el que las crezcamos.

Si vamos a generar ratones con ellas, hay que recurrir a dos técnicas más elaboradas, la formación de teratomas y/o la generación de quimeras. La formación de teratomas es el método clásico para demostrar que las células son capaces de contribuir a las tres capas germinales y se realiza inyectando las células ES bajo la piel de ratones inmunológicamente comprometidos; si las células son pluripotentes, se formará un tumor, teratoma, en el que tras su evaluación morfológica observaremos células con morfologías típicas de las tres capas germinales. El método más informativo de la calidad de las células ES es la inyección de éstas en blastocistos o mórulas para llevarlas a un ambiente embrionario de nuevo y ver si son capaces de contribuir a todos los tejidos somáticos y germinales del animal adulto. El color de los animales de los que proceden los embriones que inyectamos (normalmente fondos albinos) es distinto del de los animales de los que proceden las células ES (generalmente negros o agutíes), para poder ver fácilmente esta contribución (ver Figura 6).

Aplicaciones

La principal aplicación de las células madre embrionarias de ratón es su utilización para generar ratones modificados genéticamente por recombinación homóloga o mutagénesis dirigida. Las células ES se electroporan con un vector de *targeting*, ADN exógeno que porta la modificación que queremos introducir en el genoma del ratón; este ADN se integra en el genoma de forma dirigida, dando lugar a una mutación específica en un sitio concreto previamente diseñado. Una vez modificadas, las células ES se incorporan a un embrión huésped, donde compiten con las células ES del propio embrión (la masa celular interna del blastocisto) para generar todos los linajes celulares embrionarios, incluida la línea germinal. Los animales que nacen se denominan quimeras porque derivan del embrión huésped y de las células ES introducidas (ver Figura 6). Podemos hablar de tres tipos de modelos generados con esta técnica los *knock-out* (KO), los *knock-in* (KI) y los *knock-down*.

Los *knock-out* son animales en los que se inactiva un gen determinado, bien por delección de toda o parte de su secuencia codificante o bien por interrupción de ésta. Un ratón *knock-out* es el mejor modelo para estudiar la función de un gen en el contexto fisiológico, analizando el fenotipo que resulta de la pérdida de dicha función. Se han usado en el estudio de diferentes tipos de cáncer, obesidad, enfermedades cardíacas, diabetes…También se usan para probar diferentes terapias y drogas que posteriormente se aplicarán a humanos, ya que compartimos buena parte del genoma. Tiene varias desventajas, entre ellas que puede ser que la alteración de un gen no produzca resultados visibles o que no sean aplicables al ser humano, además de que algunas inactivaciones impiden que se desarrolle el embrión del ratón (letalidad embrionaria). En la actualidad, se dispone de ratones *knock-out* para unos 10.000 genes, de los que unos 500 constituyen modelos animales de enfermedades humanas (http://www.jax.org/). Sin embargo apenas se ha conseguido reproducir un 5% de las patologías humanas con base genética conocida (alrededor de 20.000), por lo que una serie de consorcios internacionales (norteamericanos, europeos y canadienses) unieron fuerzas y recursos para producir ratones KO para todos y cada uno de los genes del ratón mediante mutagénesis dirigida en células ES
(http://www.knockoutmouse.org/
y http://www.mousephenoytype.org/).

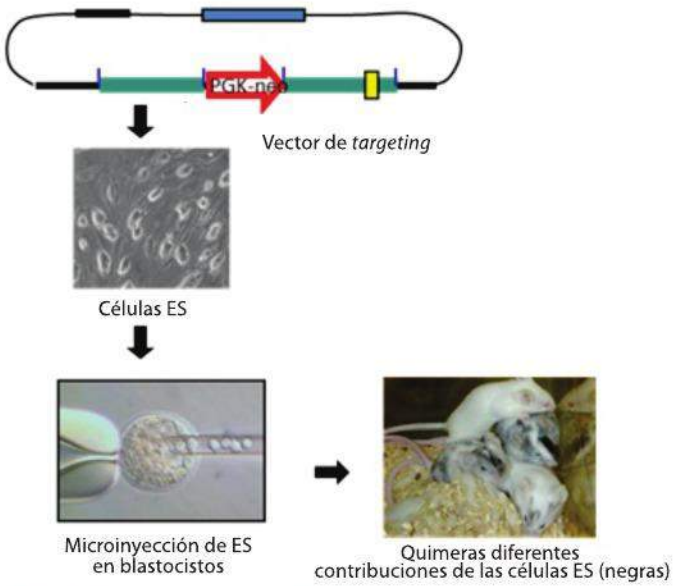


Figura 6.- Esquema de la generación de quimeras.

Los ratones *knock-in* (KI) son lo opuesto a los KO. Son animales en los que la mutación introducida provoca la expresión de una proteína nueva o diferente (se puede cambiar un aminoácido por otro, mutando un codón o se puede unir un gen reportero como GFP a la expresión de una proteína para localizarla en el organismo), no inactiva el gen, sino que le da una nueva función. Los modelos *knock-in* se utilizan sobre todo para reproducir en el ratón alteraciones genéticas tales como mutaciones puntuales, o pequeñas delecciones o inserciones que se encuentran en patologías humanas, o que son relevantes para el estudio de la función génica. Por ejemplo, mutaciones oncogénicas identificadas en tumores humanos. También se puede sustituir un gen del ratón por su homólogo en humanos, generando lo que se denominan ratones humanizados.

Los ratones *knock-down* son aquellos en los que la expresión del gen de interés se encuentra reducida, gracias a la expresión de pequeñas secuencias de ADN o ARN que se unen de forma complementaria a dicho gen. Los *knock-down* son frecuentemente utilizados a la hora de desentrañar en qué procesos está implicado un gen secuenciado del que no se conoce su función.

La investigación básica sobre el cultivo, mantenimiento de la pluripotencia y diferenciación de las células madre embrionarias de ratón, ha servido para sentar las bases de otras investigaciones punteras que se están desarrollando en la actualidad; es el caso de la generación de células madre embrionarias humanas [16], de células pluripotentes inducidas o iPS [17] o de células madre embrionarias haploides hESCs [18] que han abierto un nuevo universo de posibilidades en diferentes campos, desde la investigación básica, el estudio del desarrollo o el envejecimiento celular, hasta la medicina regenerativa para curar mediante trasplantes de células madre enfermedades genéticas como diabetes, Parkinson o Alzheimer.

Sólo hace 33 años que se consiguieron generar las primeras células ES de ratón y el campo sigue abierto y avanzando a un ritmo vertiginoso; aún son muchas las sorpresas que nos quedan por descubrir y conocer en este apasionante mundo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abad M., *et al. Reprogramming in vivo procedures teratomas and iPSCs with totipotency features.* Nature 2013, 502: 340-5.
2. Evans M.J., *et al. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.* Nature 1981, 292: 154-6.
3. Martin G.R. *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.* Proc Natl Acad Sci USA 1981, 78(12): 7634-8.
4. Bradley A., *et al. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines.* Nature 1984, 309: 255–6.
5. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2007/press.html
6. Gossler A., *et al. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines.* Proc Natl Acad Sci USA 1986, 83(23): 9065-9.
7. Robertson E., *et al. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector.* Nature 1986, 323: 445-8.
8. Smithies O., *et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination.* Nature 1985, 317: 230-4.
9. Koller B.H., *et al. Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells.* Proc Natl Acad Sci USA 1989, 86(22): 8927-31.
10. Thomas K.R., *et al. Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development.* Nature 1990, 346: 847-50.
11. Austin C.P., *et al. The knockout mouse project.* Nat Genet 2004, 36(9): 921-4.
12. Bryja V., *et al. An efficient method for the derivation of mouse embryonic stem cells.* Stem Cells 2006, 24(4): 844-9.
13. Ying Q.L., *et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal.* Nature 2008, 453: 519-23.
14. Gertsenstein M., *et al. Efficient generation of germ line transmitting chimeras from C57BL/6N ES cells by aggregation with outbred host embryos.* PLoS One. 2010 Jun 22, 5(6).
15. Jennifer Nichols. International prize for excellence in 3Rs research 2009. http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=893#126.
16. Ware C.B., *et al. Derivation of naive human embryonic stem cells.* Proc Natl Acad Sci USA 2014 Mar 12. [Epub ahead of print].
17. Takahashi K., *et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.* Cell 2006, 126: 663-76.
18. Leeb M., *et al. Derivation of haploid embryonic stem cells from mouse embryos.* Nature 2011, 479: 131-4.

Foto: shutterstock

Células madre embrionarias humanas: Presente y futuro

Sergio Ruiz
Laboratorio de Inestabilidad Genómica, CNIO, Madrid

Las células madre embrionarias humanas o hESCs (del inglés *human embryonic stem cells*) representan una plataforma celular excelente para estudiar biología humana del desarrollo, modelizar enfermedades *in vitro*, implementar estrategias en la búsqueda de nuevas drogas o desarrollar protocolos eficientes de producción celular masiva con aplicaciones clínicas. Además, los recientes avances en el perfeccionamiento de los protocolos de diferenciación hacia células altamente especializadas, como neuronas o cardiomiocitos, hacen posible estudiar el efecto específico de determinadas alteraciones genéticas en diferentes tipos celulares humanos *in vitro*. Todo ello hace de las hESCs un modelo excelente hoy, y una herramienta con infinitas posibilidades para el futuro cercano.

Breve historia sobre el aislamiento de las hESCs

La posibilidad de cultivar *in vitro* hESCs se debe en gran medida al conocimiento adquirido tras el aislamiento en 1964 de células tumorales provenientes de teratocarcinomas, un tipo de tumor derivado de células de la línea germinal [1]. Estas células crecían indefinidamente, tenían una morfología similar a la de las células embrionarias y eran pluripotentes, ya que poseían la capacidad de diferenciar hacia las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) [1]. Aunque las células EC (del inglés *embryonic carcinoma*) se utilizaron como modelo inicial para el estudio de la morfogénesis embrionaria, el hecho de que contuvieran mutaciones y aberraciones genéticas forzó a los investigadores a desarrollar protocolos para aislar células pluripotentes directamente de embriones. Ello llevó a que en 1981, dos grupos independientes consiguieran establecer líneas de células madre embrionarias de ratón (mESCs, del inglés *mouse embryonic stem cells*) lo que dio origen, tal y como se ha descrito en otros capítulos, a una herramienta celular con infinitas posibilidades [2,3]. No obstante, a pesar de la enorme utilidad que el aislamiento de las mESCs ha representado para el avance del conocimiento científico, existía la necesidad de establecer un modelo similar pero de células humanas.

La tarea de aislar y mantener en cultivo líneas de hESCs no fue fácil ni desde el punto de vista técnico ni desde el ético, ya que su obtención implicaba la destrucción de embriones humanos. Un paso crítico hacia este objetivo fue el del aislamiento, realizado por el grupo de James A. Thomson, de una línea de células madre embrionarias de primate no humano, en concreto del mono *Macaca mulatta* [4]. Para ello, y de forma similar a como se hizo para obtener mESCs, la masa interna de células (ICM, del inglés *inner cell mass*) de blastocistos, se micro-diseccionó y se plaqueó sobre una capa de fibroblastos murinos irradiados (MEFs, del inglés *mouse embryonic fibroblasts*) en un medio de cultivo que contenía LIF (del inglés *leukemia inhibitory factor*) de origen humano [4]. Estas células eran morfológicamente similares a las células EC humanas, expresaban marcadores de pluripotencia y diferenciaban *in vivo* a células de las tres capas embrionarias [4]. Thomson y colaboradores observaron que el crecimiento de esta línea celular era independiente de LIF. Sin embargo, dependía de algún factor desconocido secretado por los MEFs, lo que sugería que las células pluripotentes de primate obtenidas eran, de alguna forma, diferentes a las murinas [4].

No fue hasta 1998 cuando el mismo grupo liderado por James A. Thomson describió por primera vez un protocolo para establecer líneas de hESCs en cultivo [5]. Para ello, utilizaron embriones humanos sobrantes y provenientes de clínicas especializadas en fecundación *in vitro*. Tal y como se obtuvieron las líneas celulares de células pluripotentes de ratón o de primate, los embriones humanos se cultivaron *in vitro* hasta el estadio de blastocisto (4-5 días post-fertilización) y la ICM se micro-diseccionó y se extendió sobre una capa de MEFs [5] (ver Figura 1*a*). En este primer trabajo se describió el aislamiento de un total de 5 líneas de hESCs (dos XX y tres XY) y que originaron a la serie de líneas H, algunas de las cuales, como las líneas H1 o H9, se encuentran entre las más usadas en laboratorios de todo el mundo. Interesantemente, tal y como se describió con las células pluripotentes de primate, la capacidad de auto-renovación y el estado indiferenciado de las líneas de hESCs era independiente de la presencia de LIF pero dependiente de algún factor "X" secretado

por los MEFs. Años más tarde se descubrió que el factor "X" se correspondía con el bFGF (del inglés *basic fibroblast growth factor*), lo que demostraba la existencia de diferencias inherentes entre las células pluripotentes de ratón y las humanas [6,7].

A día de hoy, apenas 15 años después, la evolución en las técnicas que permitieron el primer aislamiento de hESCs así como en los protocolos de cultivo *in vitro* han permitido popularizar este modelo celular. Existen numerosos catálogos de líneas de hESCs aisladas en múltiples laboratorios y países del mundo, provenientes de diferentes etnias y con determinadas alteraciones genéticas que han ayudado a establecer un campo de investigación muy activo en la actualidad.

Pluripotencia de las hESCs

A consecuencia de las propiedades que caracterizan tanto las mESCs como las líneas celulares pluripotentes obtenidas de primates no humanos se propuso que las líneas de hESCs debían cumplir con los siguientes requisitos: (i) ser derivadas de embriones humanos obtenidos previamente a la implantación en estado de blastocistos, (ii) mantener un estado de proliferación indefinido *in vitro* y (iii) ser pluripotentes y tener la capacidad intrínseca de formar derivados celulares de las tres capas embrionarias. En relación a este último supuesto, por razones éticas así como por limitaciones técnicas, la generación de embriones humanos quiméricos junto a la evaluación de transmisión a la línea germinal (procedimiento estándar en el caso de mESCs y que demuestra el potencial pluripotente de estas células) no se realiza con las líneas de hESCs. En este caso, para demostrar el potencial pluripotente de las hESCs, el procedimiento aceptado comprende la diferenciación:

a) *in vitro:* mediante la formación de cuerpos embriodes o EBs (del inglés *embryoid bodies*). Estos EBs se consiguen mediante la suspensión de colonias enteras de hESCs que se repliegan formando un cuerpo esférico a modo de embrión. Ésta es la primera etapa del proceso de diferenciación, que suele continuar con los EBs adheridos a placa (ver Figura 1*b,c*).

b) *in vivo:* mediante inyección de las hESCs de forma subcutánea o bien en el interior del testículo o en la cápsula suprarrenal de ratones inmunodeficientes para evaluar la formación de teratomas, un tumor benigno altamente diferenciado. En ambos protocolos de diferenciación se determina la correcta diferenciación de las líneas de hESCs hacia las tres capas embrionarias mediante el análisis de determinados marcadores característicos de cada una las capas embrionarias (ver Figura 1*d-f*).

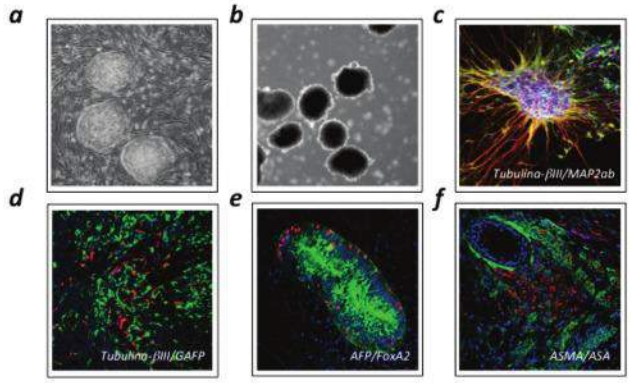


Figura 1.- ***a)*** Morfología de colonias de hESCs creciendo sobre una capa de fibroblastos inactivados por irradiación (imagen tomada a 10X). Nótese que las colonias de hESCs son grandes, muy planas y constan de entre varios centenares a varios miles de células. ***b)*** Aspecto morfológico de cuerpos embrioides (EBs) en suspensión (imagen tomada a 20X). ***c)*** Neuronas obtenidas a través de la diferenciación especializada de hESCs mediante la formación de EBs. Estas neuronas expresan los marcadores neuronales tubulina-βIII (en rojo) y dendríticos MAP2ab (en verde). El amarillo indica co-localización. ***d-f)*** Inmunofluorescencias realizadas en diferentes secciones de un teratoma, tumor producido tras la inyección subcutánea de hESCs en ratones, y que muestra la capacidad de diferenciación de las hESCs *in vivo* hacia las tres capas embrionarias. En concreto, se puede observar la formación de derivados ectodérmicos ***d)*** tubulina-βIII (en rojo) y GFAP (del inglés *glial fibrillary acidic protein*) un marcador de glía (en verde); endodérmicos ***e)*** AFP o alfa-fetoproteína (en verde) y FoxA2 (en rojo); y mesodérmicos ***f)*** ASMA (del inglés *alpha smooth muscle actin* - en verde) y ASA (del inglés *-sarcomeric actin* - en rojo). Imágenes tomadas a 40X.

Diferencias entre las mESCs y las hESCs

Como se ha mencionado anteriormente, la primera diferencia entre las células madre embrionarias de origen murino y humano reside en los requerimientos que tienen ambos tipos de células para mantener su capacidad de auto-renovación [8]. En el caso de las mESCs, dicha capacidad depende de la vía de señalización LIF/Stat3 mientras que en el caso de las hESCs depende de la vía bFGF/TGF. Además, existen diferencias adicionales entre ambos tipos celulares (ver Tabla 1) entre las que destacarían las siguientes: (i) morfología: las mESCs crecen formando colonias en más de una capa celular, en forma de iglú, mientras que las colonias que forman las hESCs son muy planas y normalmente crecen en mono-capa, (ii) individualización: mientras que las mESCs pueden ser individualizadas mediante tripsina (con lo que pueden establecerse fácilmente líneas celulares clonales), las hESCs sufren de apoptosis cuando son individualizadas, (iii)

inactivación de cromosoma X: las líneas de hESCs con dos cromosomas X sufren de la inactivación de uno de ellos mientras que en líneas similares de mESCs ambos cromosomas X se encuentran activos y (iv) ciclo celular: aunque ambos tipos de células pluripotentes se caracterizan por proliferar muy activamente, la duración media del ciclo celular es considerablemente menor en el caso de las mESCs.

Inicialmente, las diferencias existentes entre mESCs y hESCs, aunque ambas cumplen con los criterios que caracterizan a una célula pluripotente, se atribuyeron a que provenían de diferentes especies. Hoy sabemos que simplemente se trata de dos tipos diferentes de células pluripotentes [8]. De hecho, aunque ambos tipos de células provienen de la ICM de blastocistos previos a la implantación, las células pluripotentes que se obtienen de embriones humanos corresponden a un estadio embrionario más tardío y posterior a la implantación conocido como epiblasto [8]. Es por ello que las mESCs son consideradas embriológicamente más tempranas habiendo recibido menos señales de especificación en comparación con las hESCs. Es importante resaltar que en los últimos años se ha descrito la obtención de líneas de mESCs con características epiblásticas y, por tanto, similares a las hESCs, así como líneas de hESCs con las características observadas en las mESCs [9,10]. No obstante, la relevancia clínica así como si ambos tipos de células pluripotentes humanas presentan una diferente capacidad de diferenciación o maduración de las células diferenciadas provenientes de ellas, necesita de más estudios.

	mESCs	hESCs
Morfología	Colonias pequeñas en forma de "iglú"	Colonias grandes, planas y en mono-capa
Vía de señalización-capacidad de auto-renovación	LIF/Stat3	bFGF/TGF
Inactivación del cromosoma X	Ambos cromosomas X activos	Inactivación de un cromosoma X
Disociación individual	Resistentes a individualización	Sensibles a individualización
Capacidad de recombinación homóloga	Alta capacidad	Media-baja capacidad
Potencial para diferenciar a primordios de células germinales (PCGs)	Refractivas a diferenciación hacia PCGs	Diferencian fácilmente hacia PCGs
Contribución en la formación de quimeras	Contribuyen eficientemente a la formación de quimeras	Baja contribución a la formación de quimeras
Ciclo celular	Muy rápido (10-11 horas)	Rápido (15-20 horas)

Tabla 1.- Principales diferencias entre mESCs y hESCs.

Potencial clínico de los derivados celulares provenientes de hESCs

Debido a la gran plasticidad, capacidad de auto-renovación y crecimiento ilimitado, las hESCs tienen el potencial para convertirse en herramientas fundamentales en protocolos de medicina regenerativa y reemplazo celular/tisular tras un accidente o una enfermedad. Gracias a la pluripotencia de las hESCs, estas células se pueden potencialmente diferenciar a los más de 200 tipos celulares especializados del organismo humano. Los avances en el desarrollo de protocolos de diferenciación cada vez más complejos permiten inducir, desde una simple especialización hacia un linaje determinado (por ejemplo hacia células endodérmicas), hasta la obtención de células funcionales altamente especializadas (p. ej. neuronas dopaminérgicas o células del oído interno). La introducción de mejoras técnicas, nuevos materiales o la diferenciación inducida en el espacio 3D así como el uso de nuevos compuestos químicos muy específicos, han permitido la formación *in vitro* de micro-órganos también llamados organoides que pueden ser utilizados como estructuras complejas para realizar implantes *in vivo* [11,12].

Además de ser consideradas como una alternativa viable al trasplante de órganos en un futuro cercano, las células diferenciadas provenientes de hESCs se usan como modelo para realizar estudios de toxicología, modelos pre-clínicos o para el descubrimiento de nuevas drogas o compuestos químicos que puedan aliviar un determinado fenotipo *in vitro*. De hecho, se espera que entre las enfermedades que podrán ser tratadas en un futuro cercano se encuentran un gran número de enfermedades genéticas del sistema hematopoyético así como enfermedades de tipo neurológico (Parkinson, Alzheimer...) o cardiológico. Además del componente ético que rodea al uso de hESCs se encuentran los problemas asociados al trasplante alogénico. Sin embargo, estos problemas se pueden solventar mediante la creación de bancos celulares de líneas hESCs con diferentes haplotipos, el uso de las recientemente descritas células pluripotentes inducidas o hiPSCs (del inglés *human induced pluripotent stem cells*) o la clonación terapéutica mediante transferencia nuclear de células somáticas en oocitos [13].

El futuro de la medicina regenerativa basada en el uso de células pluripotentes es realmente prometedor aunque aún pasarán años hasta que se vean los beneficios desde un punto de vista clínico. Era previsible que los primeros protocolos clínicos se realizarán con derivados celulares provenientes de hESCs y no de

hiPSCs, debido a que es necesario determinar en primer lugar la identidad funcional entre estos dos tipos de células pluripotentes así como el que se determine que las hiPSCs son completamente seguras. En enero de 2009, la FDA, el organismo americano que controla la aprobación de ensayos clínicos, aprobó la realización de ensayos clínicos de fase I en pacientes con lesiones medulares. El ensayo consistía en la inyección intra-espinal de oligodendrocitos diferenciados de hESCs en individuos accidentados con lesiones medulares recientes, ya que el éxito del protocolo dependía de que la inyección de estos progenitores celulares se realizara antes de que el tejido dañado cicatrizara. La aceptación por parte de la FDA de este primer ensayo clínico estaba contagiada por el optimismo de los resultados presentados por la compañía Geron Corporation en los que se había observado una recuperación parcial en la movilidad de ratas con lesiones medulares sometidas a un protocolo similar al descrito arriba [14]. A pesar de que finalmente un total de 4 pacientes participaron en el ensayo clínico, Geron Corporation decidió abandonar el ensayo aduciendo cuestiones económicas. Por otro lado, otros dos ensayos clínicos con derivados celulares provenientes de hESCs fueron aprobados por la FDA y llevados a cabo por la compañía Advanced Cell Technology. En estos ensayos, células epiteliales pigmentarias de retina obtenidas tras la diferenciación de hESCs se introdujeron en pacientes afectados de distrofia macular de Stargardt y de un tipo de degeneración macular. En 2012 se publicaron resultados preliminares en los que se describía la ausencia de efectos adversos debidos a la introducción de las células así como cierta mejora en la capacidad de visión de los pacientes [15].

Conclusiones

Como ya se ha mencionado en este artículo, las hESCs son un modelo excelente para estudiar embriología humana, para investigar fenotipos específicos de enfermedades humanas *in vitro* o para usarlas como plataforma en la búsqueda de nuevos compuestos activos. Aunque las primeras líneas de células madre embrionarias humanas se aislaron hace apenas 15 años, el campo ha evolucionado a una velocidad vertiginosa y prueba de ello es que los primeros ensayos clínicos con células derivadas de hESCs están ya en marcha. Junto a sus "hermanas" las hiPSCs, el futuro de las células humanas pluripotentes sólo puede ser brillante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kleinsmith L.J., *et al. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells.* Cancer Res 1964, 24: 1544-51.
2. Evans M., *et al. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos.* Nature 1981, 292: 154–6.
3. Martin G. *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.* Proc Natl Acad Sci USA 1981, 78: 7634–8.
4. Thomson J.A., *et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line.* Proc Natl Acad Sci USA 1995, 92: 7844-8.
5. Thomson J.A, *et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocists.* Science 1998, 282: 1145–7.
6. Xu R.H., *et al. Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells.* Nature Methods 2005, 2: 185–90.
7. Xu C., *et al. Basic fibroblast growth factor supports undifferentiated human embryonic stem cell growth without conditioned medium.* Stem Cells 2005, 23: 315-23.
8. Hassani S.N., *et al. Signaling roadmap modulating naive and primed pluripotency.* Stem Cells Dev 2014, 23: 193-208.
9. Gafni O., *et al. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells.* Nature 2013, 504: 282-6.
10. Najm F.J., *et al. Isolation of epiblast stem cells from preimplantation mouse embryos.* Cell Stem Cell 2011, 8: 318-25.
11. Lancaster M.A., *et al. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly.* Nature 2013, 501: 373-9.
12. Takasato M., *et al. Directing human embryonic stem cell differentiation towards a renal lineage generates a self-organizing kidney.* Nat Cell Biol 2014, 16: 118-26.
13. Tachibana M., *et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer.* Cell 2013, 153: 1228-38.
14. Keirstead H.S., *et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury.* J Neurosci 2005, 25: 4694–705.
15. Schwartz S.D., *et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report.* Lancet 2012, 379: 713-20.

ANIMALES DE LABORATORIO
Primavera 2014. Número 61

Células pluripotentes inducidas (iPS): Desarrollo y aplicaciones en investigación básica y clínica

Sagrario Ortega
Unidad de Ratones Transgénicos. Programa de Biotecnología. CNIO

Introducción

Las células pluripotentes inducidas o células iPS (del inglés, *induced pluripotent stem cells*) derivan de células somáticas diferenciadas que, mediante la expresión ectópica de un número reducido de factores de transcripción, retornan al estado de células pluripotentes similares a las células madre embrionarias o células ES (del inglés, *embryonic stem*), de las que derivan todas las células del organismo. La obtención de células iPS es uno de los logros más destacables de la ciencia en los últimos tiempos. No sólo demuestra inequívocamente que la diferenciación celular es un proceso reversible sino que, además, permite obtener células pluripotentes sin necesidad de manipular embriones, un tema controvertido por sus repercusiones éticas en el caso de la utilización de células pluripotentes de origen humano. Aunque el mecanismo molecular de la reprogramación celular aún no se conoce con detalle, las aplicaciones potenciales de las células iPS en el estudio de las enfermedades y en terapia regenerativa han hecho que estas células se conviertan en un foco de atención de la investigación biomédica actual. Además, el profundizar en el mecanismo molecular de la reprogramación es muy importante para entender procesos esenciales como el envejecimiento, la identidad celular, el desarrollo y el cáncer.

Obtención de células iPS: el experimento inicial

En 2006, Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka de la Universidad de Kyoto, publicaron un trabajo seminal en el que, por primera vez, se conseguía convertir células somáticas adultas en células pluripotentes, iPS, similares a las células ES derivadas de la masa celular interna del blastocisto, mediante la expresión ectópica en las células diferenciadas de cuatro genes: *Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc* (OSKM) [1]. Este proceso de des-diferenciación inducida se llama reprogramación directa. Hasta entonces, la reprogramación celular sólo era posible mediante transferencia del núcleo de la célula diferenciada a un oocito enucleado, demostrada por primera vez por Sir John Gurdon en anfibios en los años 50 y en mamíferos con la clonación de la oveja Dolly en 1997. John Gurdon y Shinya Yamanaka obtuvieron el Premio Nobel de Medicina o Fisiología en 2012 por sus respectivos descubrimientos en el campo de la reprogramación celular.

Los genes OSKM son factores de transcripción que se expresan en células pluripotentes y, a su vez, controlan la expresión de otros muchos genes. La expresión de los factores OSKM es suficiente para revertir el patrón epigenético del genoma de las células diferenciadas al de células pluripotentes. La selección de estos cuatro genes resultó de un proceso de prueba y error, por el que una colección de veinticuatro retrovirus, cada uno de ellos portador de un gen relacionado con el mantenimiento de la pluripotencia celular, se utilizaron para infectar fibroblastos de ratón en diferentes combinaciones. OSKM era la combinación que contenía el menor número de genes y que, después de la infección, promovía la formación de colonias de células con características de células ES entre los fibroblastos.

Las células iPS así obtenidas cumplen todos los criterios funcionales de pluripotencia de las células ES murinas, incluso la contribución a la línea germinal en ratones quimera y la complementación de embriones tetraploides. Sin embargo, los ratones generados con células iPS reprogramadas con los factores OSKM desarrollaban tumores como consecuencia de la re-activación de la expresión retroviral del oncogén *c-Myc* en algunas células. Un año más tarde, dos grupos, incluido el de Yamanaka, demostraron que *c-Myc* no es esencial para la reprogramación, aunque sin *c-Myc* el proceso es menos eficiente y requiere una exposición más prolongada a los factores de reprogramación.

Células iPS humanas

Sólo un año después de la publicación del experimento de Takahashi y Yamanaka se obtuvieron las primeras iPS derivadas de células humanas, mediante expresión retroviral de dos combinaciones de factores diferentes, *OCT4, SOX2, KLF4* y *c-MYC*, y *OCT4, SOX2, NANOG* y *LIN8*. Estos experimentos demostraron por primera vez que la combinación de los factores OSKM de Yamanaka, no era la única que podía reprogramar células somáticas diferenciadas, sino que otros factores de transcripción

relacionados con el mantenimiento de la pluripotencia, como *NANOG* y *LIN8*, podían reemplazar a algunos de estos factores [2]. Además se ponía de manifiesto que la reprogramación directa no era algo exclusivo de células de ratón. Actualmente, existen células iPS de muy diferentes especies (rata, conejo, cerdo, perro, oveja, caballo, mono Rhesus, primates, etc.) que se describen con detalle en otro capítulo de esta monografía, demostrando que los mecanismos moleculares que controlan la pluripotencia celular están conservados evolutivamente.

Desde el establecimiento de las primeras células pluripotentes (células ES) humanas en 1998, las células pluripotentes han sido el punto de mira como herramienta en terapia celular. Sin embargo, la utilización de células ES humanas con fines terapéuticos es controvertida por las implicaciones éticas asociadas a la manipulación de embriones. La obtención de células iPS por reprogramación directa de células adultas diferenciadas elimina este problema. Además, tiene la ventaja de que permitiría realizar trasplantes autólogos, ya que el donante y el receptor de las células pueden ser el mismo individuo, eliminando también los problemas de rechazo inmunológico.

Origen celular y reprogramación

Un amplio repertorio de células somáticas diferenciadas adultas procedentes de las tres capas embrionarias (mesodermo, ectodermo y endodermo) han sido reprogramas con éxito utilizando la combinación de factores de Yamanaka o ligeras variaciones de la misma. Algunos ejemplos son fibroblastos de piel, linfocitos B y T, células hematopoyéticas, células adiposas, células endoteliales del cordón umbilical (derivadas del mesodermo), progenitores neurales, melanocitos, queratinocitos (derivadas del ectodermo) y células beta pancreáticas, hepatocitos, células del epitelio gástrico (derivadas del endodermo) entre otras [3,4].

El origen de las células reprogramadas influye en la combinación de factores necesarios para la reprogramación y en la eficiencia del proceso. En general, cuanto menos diferenciada está una célula (más carácter progenitor) más fácil es des-diferenciarla al estado pluripotente. Por ejemplo, los progenitores neuronales expresan altos niveles de *Sox2 y c-Myc* y por tanto pueden ser reprogramados mediante la expresión ectópica de sólo *Oct4* y *Klf4* o incluso, con más baja eficiencia, de sólo *Oct4*. Del mismo modo, progenitores hematopoyéticos pueden ser reprogramados con una eficiencia del 25% mediante el cocktail de Yamanaka, mientras que los linfocitos B presentan una eficiencia de sólo 0.02% cuando se reprograman en la mismas condiciones.

Mecanismo molecular y aplicaciones básicas

La reprogramación directa se basa en la actividad de un número sorprendentemente reducido de factores de transcripción: *OSKM, OSK* o ligeras variaciones de los mismos. Basta la expresión de estos genes para modificar el patrón epigenético del genoma, es decir, las modificaciones químicas (metilación y acetilación) de la cromatina (ADN e histonas) que determinan qué genes se expresan o dejan de expresarse en cada tipo celular. Estos cambios epigenéticos resultan en la activación de la expresión de genes de pluripotencia endógenos *Oct4, Sox2, Nanog* y otros que están normalmente silenciados en las células diferenciadas y, simultáneamente, en el silenciamiento de la expresión de factores de transcripción que mantienen la identidad celular en las células diferenciadas, como p. ej. el gen Pax5 en linfocitos B. Una vez que estos cambios de expresión génica se producen en las células diferenciadas, unas 3-4 semanas desde la infección con los retrovirus, las células se hacen independientes de la expresión ectópica retroviral de los factores OSKM para mantenerse pluripotentes (ver Figura 1).

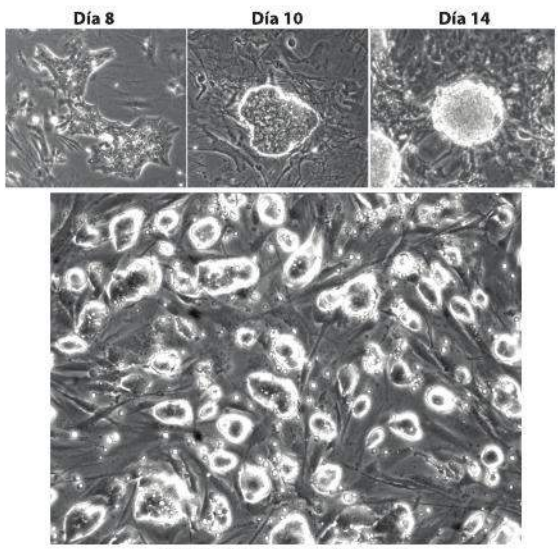


Figura 1.- Células iPS de ratón en distintas fases de reprogramación a partir de fibroblastos. Los tres paneles superiores representan colonias de células reprogramadas a distintos días después de la infección con retrovirus que expresan los factores Oct4, Sox2 y Klf4. El panel inferior representa un cultivo establecido a partir de una colonia de células iPS completamente reprogramada.

De hecho, la expresión ectópica retroviral de los factores de reprogramación se silencia al cabo del tiempo por metilación de *novo* del ADN viral. Pero una vez que las células están completamente reprogramadas (iPS) sólo requieren unas condiciones de cultivo adecuadas que promuevan su auto-renovación y bloqueen su diferenciación de la misma forma que lo hacen las células ES.

La reprogramación es un proceso lento e ineficiente. Sólo un pequeño porcentaje (alrededor del 1%) de las células expuestas a los factores de reprogramación se convierte en células iPS. Además existe heterogeneicidad entre las células reprogramadas en cuanto a la "calidad" de la reprogramación. Esto es, en parte, resultado del proceso estocástico con que se producen los cambios moleculares asociados a la reprogramación. Sin embargo, la eliminación de ciertas "barreras moleculares" que constituyen un cuello de botella para que las células se reprogramen puede resultar en una reprogramación mucho más eficiente y sincrónica como se ha demostrado en el caso del complejo de remodelación y acetilación de los nucleosomas *Mbd3/NuRD*, cuya eliminación resulta en una eficiencia de reprogramación cercana al 100% en sólo siete días de exposición a los factores de reprogramación [5].

Hasta hace muy poco todas las células iPS se habían obtenido mediante reprogramación *in vitro*, en placas de cultivo. Recientemente, en un trabajo liderado por Manuel Serrano del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas en Madrid, y publicado en la revista *Nature* en 2103, se demuestra, por primera vez, que es posible obtener células iPS por reprogramación *in vivo* [6]. Ratones portadores de un transgén condicional que expresa los factores de Yamanaka (OSKM) en todas sus células en presencia de Doxiciclina (sistema Tet-ON), después de la administración temporal de Doxiciclina, contienen células reprogramadas en sus tejidos (ver Figura 2).

Las células iPS se pueden aislar y cultivar a partir de diferentes tejidos sin reprogramación adicional. Este resultado demuestra que la reprogramación directa no es un artefacto del cultivo celular, sino que puede ocurrir también en un ambiente fisiológico, *in vivo*. Además, abre nuevas vías para el desarrollo de terapias regenerativas (reprogramación *in situ* en el tejido dañado) y plantea interesantes preguntas sobre la existencia de reprogramación celular en procesos tumorales, de regeneración tisular, desarrollo, etc.

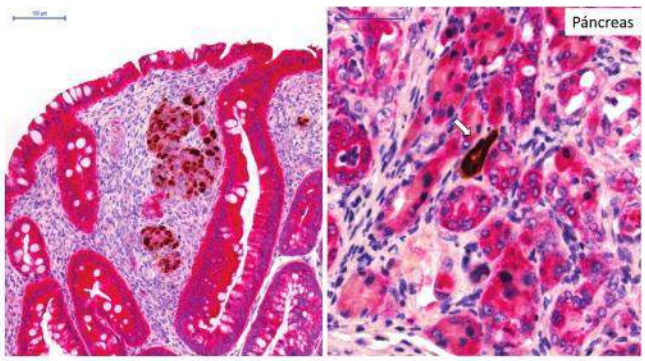


Figura 2.- Reprogramación in vivo. Inmunohistoquímica con anticuerpos anti-Nanog (marcador de células pluripotentes - marrón) y anti-CK6 (marcador de células epiteliales - rojo) en secciones de intestino y páncreas de ratones reprogramados mediante tratamiento con doxiciclina. Las flechas indican células pluripotentes en estos órganos.

Aunque el mecanismo molecular por el que se generan las células iPS aún no se conoce con detalle, su estudio es uno de los retos científicos más importantes en la actualidad. Su conocimiento es muy relevante para entender los mecanismos que controlan la identidad celular, la diferenciación o el envejecimiento. Además, existe una estrecha relación entre el proceso de reprogramación celular y el de tumorigénesis. Algunos factores de reprogramación son potentes oncogenes, como *c-Myc*. Por otro lado, nuestro trabajo y el de otros grupos han demostrado que genes supresores de tumores, como los genes que codifican para la proteína *p53* o el locus *Ink4a*, son también importantes barreras para la reprogramación; es decir, su eliminación facilita de forma muy significativa la generación de células iPS [7,8]. La ausencia de *p53* facilita también la reprogramación de células que acumulan daño en el ADN produciendo células iPS "de mala calidad" con lesiones genéticas semejantes a las que se encuentran en los tumores. Nosotros también hemos demostrado que las células con telómeros críticamente cortos y que carecen de actividad telomerasa no pueden ser reprogramadas al perder la capacidad de elongar sus telómeros hasta la longitud que tienen en las células pluripotentes. Esto explica, en parte, por qué las células procedentes de individuos de elevada edad (con telómeros más cortos) se reprograman peor que células obtenidas de individuos jóvenes, y proporciona un nexo entre envejecimiento y reprogramación celular. La obtención de células iPS a partir de ratones modificados genéticamente puede contribuir notablemente al esclarecimiento del mecanismo molecular de la reprogramación.

Obtención de células iPS sin incorporación de material genético

La utilización de retrovirus para expresar los factores de reprogramación presenta serias limitaciones a la hora de utilizar las células iPS en terapia, sobre todo por la modificación genética causada por la integración del ADN viral en el genoma celular, posible causa de tumorigenicidad. Además, el silenciamiento del ADN viral puede no ser permanente. La re-activación de la expresión de los factores de reprogramación puede ser otra causa de la tumorigenicidad de las células iPS, como se demostró en el caso del oncogén *c-Myc* en ratones. Dado que los factores de reprogramación ectópicos sólo son necesarios durante un periodo de unas 2-3 semanas y que el proceso de reprogramación no requiere cambios genéticos sino sólo epigenéticos, cabe pensar en procedimientos alternativos de reprogramación libres de ADN. A lo largo de los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo para desarrollar protocolos de este tipo.

Una alternativa a la utilización de retrovirus para expresar los factores de reprogramación es el empleo de adenovirus o plásmidos que no se integran en el genoma, o elementos genéticos que una vez integrados son escindidos sin dejar ninguna huella en el genoma (transposones). Sin embargo, el riesgo de integración de fragmentos del ADN de estos vectores en el ADN celular todavía existe y es incompatible con la utilización terapéutica de las células iPS.

Sustancias modificadoras de la cromatina, como el ácido valproico, un potente inhibidor de la enzima HDAC (histona-deacetilasa) o la 5-azacitidina, inhibidor de la enzima ADN metil-transferasa, facilitan la reprogramación en una gran variedad de sistemas y en algunos casos permiten reducir el número de factores de reprogramación a utilizar [9]. Otra aproximación, actualmente en desarrollo, es el uso de proteínas recombinantes, *OCT-4, SOX2, KLF4* y *c-MYC* a las que se ha incorporado una cola de varias Argininas (poli-Arg) que las hace capaces de atravesar la membrana citoplasmática [10]. Este método ha sido utilizado con éxito para reprogramar fibroblastos de ratón y humanos. Más recientemente, la utilización de ARNs mensajeros que codifican los factores de reprogramación, modificados químicamente para promover su estabilidad en la célula, es una tecnología emergente que puede resultar en un importante avance en las técnicas de reprogramación por su eficiencia, controlabilidad y rapidez de respuesta [11]. Es posible que la combinación de varias de estas tecnologías, libres de ADN, sea el método más eficaz para obtener células iPS de "grado clínico".

Recientemente, un grupo de investigadores pertenecientes al centro RIKEN para Biología del Desarrollo en Kobe, Japón, publicaron en la revista *Nature* un método de reprogramación celular completamente independiente de factores de transcripción que consiste en una exposición transitoria de las células a un ambiente ácido (pH 5.7). Según los autores, este tratamiento causa una reducción en el nivel de metilación de las secuencias reguladoras de los genes de pluripotencia endógenos que resulta en la activación de su expresión [12]. Sin embargo, irregularidades en la elaboración del manuscrito así como la dificultad a la hora de reproducir los resultados han despertado escepticismo en la comunidad científica sobre la veracidad de este trabajo, suscitándose una polémica que está aún por resolver.

Células iPS y terapia celular

La prueba de concepto de la aplicación terapéutica de las células iPS quedó establecida por primera vez utilizando un modelo de ratón de anemia de células falciformes, una enfermedad causada por una única mutación en el gen de la beta-globina [13]. Células iPS generadas a partir de una biopsia de la cola de estos ratones, modificadas *in vitro* para corregir la mutación causante de la enfermedad y diferenciadas, también *in vitro*, a progenitores hematopoyéticos, corregían todos los síntomas de la enfermedad cuando se re-inyectaban en los ratones donantes (trasplante autólogo). Este experimento demostraba por primera vez el modelo perfecto de aplicación terapéutica de las células iPS: una enfermedad de origen genético puede ser tratada mediante obtención de células iPS de pacientes y trasplante autólogo de las mismas después de la corrección de la mutación (ver Figura 3).

El trasplante autólogo de células iPS tiene la ventaja de que minimiza el rechazo inmunológico y la transmisión de virus o agentes infecciosos asociados al trasplante de células derivadas de donantes. Aunque todavía no se dispone de buenos métodos para corregir defectos genéticos en las células ES e iPS humanas, con los recientes avances tecnológicos para "editar" el genoma de mamíferos empleando nucleasas dirigidas, especialmente el sistema CRISPR/Cas9 [14], la posibilidad de "reparar" genéticamente las células iPS derivadas de pacientes y utilizarlas posteriormente en trasplantes autólogos está cada día más cercana.

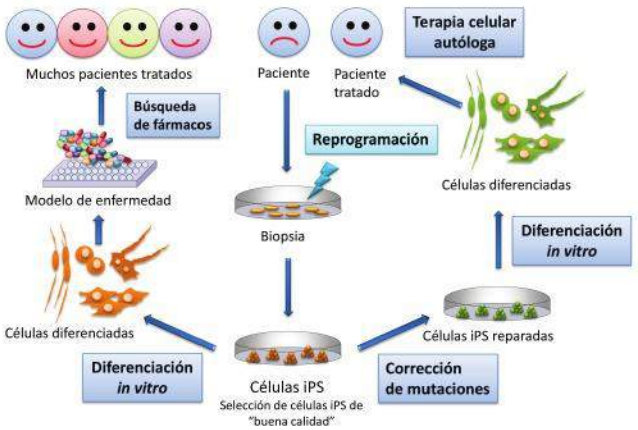


Figura 3.- Aplicaciones de las células iPS en medicina regenerativa.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que la obtención de células iPS autólogas para cada paciente conlleva un elevado coste económico. Además, en algunos casos, el tiempo que se tarda en generar suficientes células iPS para trasplante (unos 3 meses) es demasiado largo para ciertos tratamientos. Por tanto, es importante el considerar como alternativa el uso de células iPS alogénicas (derivadas de donantes compatibles) para la aplicación de las células iPS en medicina regenerativa [15].

La utilización de células iPS para trasplante celular todavía tiene que superar algunos obstáculos. Experimentos previos han demostrado que el trasplante directo de células pluripotentes (iPS o ES) puede ser tumorigénico, dando lugar a la formación de teratomas. Una posible solución a este problema es trasplantar células que hayan sido previamente diferenciadas *in vitro* (p. ej. a células progenitoras de un determinado linaje celular, neuronal, hematopoyético, etc.) a partir de las células iPS. Varios estudios han demostrado que la utilización de células previamente diferenciadas disminuye o incluso anula el riesgo de tumorigenicidad asociado al trasplante de células pluripotentes. Además, algunos estudios indican que las células iPS, incluso en trasplantes singénicos, pueden ser inmunogénicas, mientras que las células diferenciadas a partir de ellas no lo son [16]. Por tanto, uno de los retos actuales es el desarrollar protocolos robustos de diferenciación de células iPS *in vitro*. Aunque se han conseguido diferenciar eficientemente células iPS a diversos tipos celulares como progenitores cardiacos, neuronales, hematopoyéticos o células beta, hasta ahora estos cultivos de células diferenciadas no son puros. Todavía co-existen células pluripotentes en estos cultivos que es necesario eliminar antes de su utilización o desarrollar métodos para optimizar el proceso de diferenciación, haciéndolo más eficiente, seguro y fácilmente escalable, antes de que las células iPS se puedan utilizar en la clínica [17].

Hasta ahora, la capacidad de las células iPS de regenerar tejidos dañados se ha probado sólo en modelos animales [4]. La inyección de células iPS o de cardiomiocitos después de inducir isquemia cardiaca en ratones es capaz de atenuar los efectos del infarto agudo y de mejorar la funcionalidad del corazón. Varios grupos han conseguido diferenciar *in vitro* células iPS humanas a células beta maduras completamente funcionales, es decir, con la capacidad de producir insulina en respuesta a glucosa. Además, en ratones se ha podido demostrar que el trasplante de células beta diferenciadas a partir de células iPS es capaz de revertir la hiperglicemia en modelos de diabetes tipo I y II. Sin embargo, hasta ahora, la eficiencia con la que se obtienen células beta funcionales a partir de células iPS es muy baja. Asimismo, células progenitoras neurales derivadas de células iPS humanas y diferenciadas a neuronas dopaminérgicas *in vitro*, trasplantadas en modelos animales de Parkinson (en ratas y primates) mejoran la capacidad motora del animal. Todos estos experimentos apoyan la utilidad terapéutica de las células iPS en terapia regenerativa.

Dado que la utilización terapéutica de células diferenciadas parece ser más segura que la utilización de células pluripotentes, actualmente se está explorando una alternativa a la reprogramación directa que es la transdiferenciación o diferenciación directa. Este proceso consiste en convertir la identidad de una célula diferenciada directamente en otra, mediante la expresión de factores de transcripción especificadores de linaje celular, pero sin necesidad de retroceder previamente el estado de pluripotencia. Recientemente se han logrado reprogramar células de la piel directamente a células de endodermo, de donde derivan los órganos internos del cuerpo, y posteriormente a células hepáticas funcionales que consiguen rescatar el fenotipo de ratones con fallo hepático mediante trasplante [18]. Una aproximación similar se ha utilizado para obtener cardiomiocitos y células de cartílago y para determinar el destino de células germinales.

Células iPS como modelo para el estudio de las enfermedades

Aunque los modelos animales siguen siendo una herramienta clave para estudiar las enfermedades humanas, existen bastantes ejemplos de la limitación de estos modelos a la hora de reproducir de forma precisa el fenotipo de una

determinada enfermedad, lo que se traduce en el desarrollo de terapias que funcionan en modelos animales pero fallan en ensayos clínicos. Un ejemplo es el de la esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad para la que los fármacos desarrollados hasta ahora, utilizando modelos animales, no funcionan en la clínica. Las células iPS obtenidas de pacientes representan una alternativa más para modelar las enfermedades humanas que, incorporada al proceso del desarrollo de nuevas terapias, puede mejorar notablemente la fase preclínica.

El procedimiento implica reunir un número razonable de pacientes con una determinada enfermedad, generar un elevado número de células iPS de estos pacientes y después diferenciarlas al tipo celular de interés, es decir, el que esté afectado por dicha enfermedad. Es lo que se ha llamado "enfermedad en placas de cultivo". Esta aproximación permite reproducir en unos pocos meses de cultivo celular enfermedades que han tardado años en evolucionar en el paciente. Además, es una herramienta muy potente para estudiar marcadores de diagnóstico, identificar dianas terapéuticas, hacer búsqueda de compuestos que reviertan el fenotipo de la enfermedad y hacer ensayos toxicológicos a nivel preclínico (ver Figura 3). A día de hoy, este abordaje se está empleando para una larga lista de enfermedades entre las que se incluyen enfermedades neurodegenerativas como la atrofia muscular espinal (AME), que fue el primer modelo desarrollado, Parkinson, Alzheimer, enfermedad de Huntington, síndrome de Rett, etc.; del sistema hematopoyético como la anemia de Fanconi; cardiacas como la cardiomiopatía familiar, síndrome del QT largo; hepáticas como la hepatitis C, hipercolesterolemia familiar, etc. Para algunas de las enfermedades como la AME y el síndrome de Rett ya se ha conseguido identificar compuestos que revierten el fenotipo de la enfermedad en células reprogramadas *in vitro* lo que supone un gran avance para el tratamiento de estas enfermedades y demuestra la utilidad de estos sistemas para el desarrollo de nuevas terapias [3,17].

Uno de los aspectos críticos de estos estudios es elegir el control apropiado de células iPS "no afectadas" por la enfermedad. En este sentido, células derivadas de donantes sanos no relacionados con el paciente pueden no ser suficientemente buenos controles, siendo preferible utilizar células iPS derivadas de familiares (hermanos, madres) sanos para minimizar las diferencias genéticas entre células sanas y enfermas.

Células iPS versus células ES

Las semejanzas y diferencias entre células ES e iPS es, sin duda, objeto de controversia en la investigación con células pluripotentes [19]: ¿Son iguales? ¿Son más tumorigénicas las células iPS que las células ES? Las células iPS humanas son prácticamente indistinguibles de las células ES en cuanto a morfología, expresión génica, patrón epigenético y capacidad de diferenciación *in vitro* (formación de cuerpos embrionarios) y formación de teratomas. Sin embargo, algunos estudios han puesto de manifiesto diferencias genéticas y epigenéticas entre células iPS y células ES. Mediante análisis genéticos globales de alta resolución, varios grupos han identificado en las células iPS variaciones en el número de copias de algunas regiones del genoma, así como mutaciones puntuales en la secuencia codificante de genes relacionados con cáncer. Estas alteraciones podrían producirse durante el proceso de reprogramación y su identificación apoya el concepto de que las células iPS son más tumorigénicas que las células ES. Sin embargo, este mismo tipo de análisis realizado por otros grupos no ha detectado ninguna diferencia a nivel genético entre células iPS y ES, concluyendo que las diferencias se deben a una reprogramación incompleta en la población analizada. Por otro lado, algunas de las mutaciones encontradas en las células iPS aparecen también en las células ES a alto número de pases. Del mismo modo, estudios epigenéticos comparando el patrón de metilación del ADN entre células ES e iPS han puesto de manifiesto lo que se denomina "memoria epigenética", es decir, conservación parcial del patrón epigenético de las células de partida en las células iPS derivadas de las mismas. Aunque la mayoría de estas diferencias epigenéticas desaparecen con los pases en cultivo, algunas son permanentes. Esta "memoria epigenética" tiene como consecuencia que las células iPS se diferencien más fácilmente al tipo celular del que derivan que a otros tipos celulares. Aún está por determinar si estas diferencias tienen lugar en células totalmente reprogramadas y son intrínsecas al proceso de reprogramación, o si se trata de algunas células que no se han reprogramado completamente en el cultivo. En cualquier caso, esta memoria epigenética puede ser explotada funcionalmente reprogramando células de un determinado origen (p. ej. células de médula ósea que derivan del mesodermo para obtener tipos celulares del mismo origen como cardiomiocitos o adipocitos).

Conclusiones

Desde la publicación del trabajo de Takahashi y Yamanaka en 2006 hasta la actualidad, la investigación con células iPS ha avanzado vertiginosamente. Sin embargo, la utilización terapeútica de estas células todavía tiene que superar algunos obstáculos. Actualmente, la reprogramación sigue siendo un proceso ineficiente y las colonias de células iPS que se obtienen por este proceso son heterogéneas, es decir, no todas son "de buena calidad". Además, varios estudios alertan sobre el carácter tumorigénico de las células pluripotentes en general y de las células iPS en particular. A nivel práctico, algunos de los principales retos a superar son los siguientes: definir cuál es la mejor fuente de células somáticas a reprogramar, conseguir una reprogramación eficiente libre de material genético, escalar la producción de células iPS derivadas de pacientes, establecer protocolos robustos de diferenciación sin contaminación de células pluripotentes o de trans-diferenciación directa entre distintos tipos de células somáticas, y establecer sistemas robustos para corregir mutaciones causantes de enfermedad en las células iPS derivadas de pacientes. Además, estudios a largo plazo son necesarios para establecer el nivel de riesgo en la utilización de células reprogramadas (p. ej. tumorigenicidad). E indudablemente, es esencial alcanzar un mejor conocimiento del mecanismo molecular de la reprogramación para obtener células iPS de "calidad terapéutica".

BIBLIOGRAFÍA

Por razones de límite de espacio no se citan todos los trabajos originales a los que se refiere este capítulo. En su lugar, se han seleccionado algunas de las referencias más relevantes para su consulta.

1. Takahashi K, *et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblasts cultures by defined factors.* Cell 2006, 126: 663-76.
2. Yu J., *et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.* Science 2007, 318: 1917-20.
3. Stadtfeld M., *et al. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications.* Genes Dev 2010, 24: 2239-63.
4. Ye L., *et al. Induced pluripotent stem cells and their potential for basic and clinical sciences.* Curr Cardiol Rev 2013, 9: 63-72.
5. Rais Y., *et al. Deterministic direct reprogramming of somatic cells to pluripotency.* Nature 2013, 502: 65-70.
6. Abad M., *et al. Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features.* Nature 2013, 502: 340-5.
7. Li H., *et al. The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming.* Nature 2009, 460: 1136-9.
8. Marión R.M., *et al. A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity.* Nature 2009, 460: 1149-53.
9. Huangfu D., *et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds.* Nat Biotechnol 2008, 26: 795-7.
10. Zhou H., *et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins.* Cell Stem Cell 2009, 4: 381-4.
11. Warren L., *et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA.* Cell Stem Cell 2010, 7: 618-30.
12. Obokata H., *et al. Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency.* Nature 2014, 505: 641-7.
13. Hanna J., *et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin.* Science 2007, 318: 1920-3.
14. Mali P., *et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9.* Science 2013, 339: 823-6.
15. Takahashi K., *et al. Induced pluripotent stem cells in medicine and biology.* Development 2013, 140: 2457-61.
16. Guha P., *et al. Lack of immune response to differentiated cells derived from syngeneic induced pluripotent stem cells.* Cell Stem Cell 2013, 12: 407-12.
17. Inoue H., *et al. iPS cells: a game changer for future medicine.* EMBO J 2014, 33: 409-17.
18. Zhu S., *et al. Mouse liver repopulation with hepatocytes generated from human fibroblasts.* Nature 2014, Feb 23. [Epub ahead of print].
19. Bilic J., *et al. Concise review: Induced pluripotent stem cells versus embryonic stem cells: close enough or yet too far apart?* Stem Cells 2012, 30: 33-41.

SOURALIT

Madera no resinosa

Mínima presencia de polvo

Gran capacidad de absorción

Presentaciones irradiadas envasadas al vacío

Análisis microbiológicos y físico-químicos de los lotes entregados

SOURALIT | Tel.: +34 902 430 370 | Fax: +34 902 105 032 | E-mail: info@souralit.com

ANIMALES DE LABORATORIO
Primavera 2014. Número 61

Células troncales en vertebrados y sus aplicaciones al estudio y conservación de especies amenazadas o en peligro de extinción

P. Ramos-Ibeas, A. Calle A. y M.A. Ramírez
Laboratorio de Células Troncales y Transgénesis, INIA

Introducción

En la actualidad, no existe ningún uso generalizado de terapias basadas en células troncales en medicina reproductiva; sin embargo, su utilidad potencial les hace ser objeto de intensas investigaciones. En líneas generales, hay tres tipos de células troncales en las que se centra la investigación en medicina reproductiva: células troncales embrionarias (ESCs), células pluripotentes inducidas (iPSCs) y células troncales espermatogónicas (SSCs). Desafortunadamente, a pesar del gran esfuerzo científico que se está llevando a cabo, no hay todavía ESCs o iPSCs completamente caracterizadas derivadas de otras especies que no sean primates y ratón. En el presente capítulo hablaremos de las ESCs aisladas en vertebrados, así como de las iPSCs generadas a partir de ungulados domésticos, haciendo alusión a los distintos orígenes y a las particularidades de cultivo. Y a continuación sintetizaremos los usos clínicos de las células troncales en medicina reproductiva.

Células troncales embrionarias (ESCs)

Generalidades de las ESCs

En 1981, las primeras células troncales embrionarias se obtuvieron a partir de la masa celular interna (ICM) de embriones murinos [1,2]. Poco después se mostró que las ESCs pueden contribuir a todos los tejidos de ratones quiméricos después de su inyección en blastocistos. A diferencia de las células de carcinoma embrionario (ECCs), que se aislaron con anterioridad, las ESCs pueden de manera eficiente y reproducible contribuir a la línea germinal y por lo tanto, a la descendencia de quimeras [3].

Las células troncales se definen como células que tienen tanto la capacidad de auto-renovación como la capacidad de generar células diferenciadas. Una definición funcional de las células troncales embrionarias debe incluir: (i) el mantenimiento del estado de pluripotencia durante largos períodos de cultivo *in vitro* y (ii) demostración de su pluripotencia por su contribución a las tres hojas embrionarias (formación de quimeras o teratomas).

Aislamiento de ESCs a partir de embriones de vertebrados

La evolución del huevo en vertebrados da lugar por un lado a linajes extraembrionarios y, por otro lado, a células pro-embrionarias. Las células pro-embrionarias definidas como *embryogen* [4] se caracterizan por ser células pluripotentes, es decir, mantienen un estado de no diferenciación y presentan una alta capacidad mitótica. El "embryogen" recibe distintas denominaciones en función del grupo taxonómico al que hagamos referencia y en función del estadio de desarrollo. En el ratón se denomina Masa celular interna (ICM) y más tarde, epiblasto [5]. En el pollo recibe el nombre de germen, después blastodermo y a continuación, epiblasto [6]. En marsupiales es pluriblasto y después epiblasto [7]. Estas características embriogénicas únicas, pluripotencia, alto índice mitótico y estado indiferenciado, conducen directamente a su capacidad de regular y de formar células troncales embrionarias (ESCs). A continuación mostraremos una lista de vertebrados en los que se han desarrollado ESCs y estudiaremos el estadio de desarrollo embrionario en el que se derivan (ver Tablas 1, 2 y 3). Las ESCs proporcionan una excelente oportunidad para estudiar la pluripotencia celular asociada con la capacidad de permanecer indiferenciadas, manteniendo un índice mitótico alto, y también las características de las células cancerosas.

En el ratón en el día embrionario 3.5, el embrión comprende dos linajes celulares, el pluriblasto o masa celular interna (ICM) y el trofectodermo exterior (TE). Los estudios demuestran que el linaje ICM da lugar al *embryogen* y al mesodermo extra-embrionario, mientras que el TE sólo contribuye al tejido placentario [5]. Tras la distribución del hipoblasto (endodermo primitivo) desde el *embryogen*, la ICM residual se convierte en el epiblasto temprano post-implantacional. Estas células pluripotentes dan lugar rápidamente a las hojas germinales primarias en la gastrulación. El cultivo *in vitro* de la ICM permite el aislamiento de las ESCs manteniendo indefinidamente sus características de pluripotencia y auto-renovación.

Si bien el momento y el número de células varían según la taxonomía, los mamíferos euterios, incluidos los primates, coinciden en la morfología, y en la distribución de los linajes celulares (ICM y TE). En marsupiales, la distribución de los linajes es igual pero difieren morfológicamente ya que tanto ICM como TE son superficiales comprendiendo un blastocisto unilaminar. En la distribución del hipoblasto se forma un blastocisto bilaminar, en el que tanto el epiblasto como el TE son superficiales.

En las aves, el estadio X de Hamburger y Hamilton del embrión de pollo corresponde al *embryogen* como una sola capa de células (blastodermo) que consta de dos regiones visiblemente diferenciadas: el pluriblasto (zona pelúcida o disco central), a partir de la cual se desarrolla el embrión, y la zona opaca circundante que da lugar al ectodermo extraembrionario [6]. Es también en el estadio X, donde se localizan los estadios tempranos del hipoblasto, de modo que en el estadio XI, el *embryogen* (zona pelúcida) comprende tanto epiblasto como hipoblasto. Por todo ello, el estadio X de desarrollo es el empleado en aves para el aislamiento de ESCs y es también el momento empleado para realizar *gene targeting* para generar animales quiméricos.

En Zebrafish, tan sólo 40 minutos después de la fertilización ocurre la primera división meroblástica. Nueve divisiones más dan como consecuencia una agrupación de blastómeras en la parte superior de la célula yema con blastómeras marginales que mantienen puentes citoplasmáticos con la célula yema. Al comienzo de la blástula, el *embryogen* tiene 126 células y tras la décima división (mid-blástula) ya consta de 1.000 células. Durante la mid-blástula, el genoma del cigoto se activa dando lugar a los primeros tres linajes celulares del *embryogen*. Dos de ellos son linajes extra-embrionarios, la capa sincitial de la yema derivada de la disgregación de los blastómeros marginales dentro de la célula yema y la capa envolvente que forma la superficie externa del blastodermo. La tercera capa es el pluriblasto (capa de células del interior). Medaka y dorada también se desarrollan de esta manera, tipo teleósteo [8]. Para el aislamiento de ESCs de las tres especies de peces enumeradas en la Tabla 3, se usó el estadio mid-blástula o también el estadio de anillo germinal en el caso del pez cebra.

Desde la obtención inicial de las ESCs de ratón en los años 80 [1,2], intensas investigaciones por parte de muchos laboratorios han revelado mucho acerca de los métodos de propagación, la dependencia de factores de crecimiento, los mecanismos de transducción de señales, los marcadores de expresión génica y su facilidad de manipulación genética. Sin embargo, a pesar de más de 30 años de investigación, aún sabemos muy poco sobre su diferenciación a determinados tipos celulares.

Los primeros intentos para derivar ESCs en otras especies incluyeron al ganado: oveja, cerdo, vaca, conejo, hámster y visón. Las líneas celulares derivadas comparten algunas características comunes con las ESCs de ratón: la formación de colonias que en algunos casos se asemejan a las del ratón; la capacidad de propagación mediante varios o muchos pases celulares manteniendo su estado de indiferenciación y la capacidad para diferenciarse *in vitro* en una variedad de tipos celulares derivados de las tres hojas embrionarias. Sin embargo, sólo se han conseguido animales quiméricos en conejo, vaca, cerdo, pez cebra, pollo y ratón, y tan sólo se ha conseguido transmisión a línea germinal en los tres últimos.

Aunque los detalles de las condiciones de cultivo mostrados en la literatura no siempre son suficientes, y los patrones de expresión de marcadores de ESCs no son extensos o de hecho no se han llevado a cabo para la mayoría de las especies, llama la atención que haya más similitudes que diferencias en las condiciones de cultivo utilizadas para derivar ESCs de los diferentes vertebrados.

Animal	Fuente de ESCs	Duración del cultivo	Referencias bibliográficas
Ratón	Mórula, Blastocisto 3.5 dpc	A largo plazo	[1, 2]
Vaca	8, 16 células, blastocisto 7-9 dpc	Variable (>3 años)	[9]
Caballo	Blastocisto 6-7 dpc	>36 pases	[10]
Hámster	Blastocisto 3.5 dpc	>3 meses	[11]
Visón	Mórula, blastocisto 7-10 dpc	N.D.	[12]
Oveja	Blastocisto 7-13 dpc	n° de pases	[13]
Cerdo	Blastocisto 7-9 dpc	>44 pases	[13]
Conejo	Blastocisto 4-5 dpc	>1 año	[14]
Rata	Blastocisto 4-5 dpc	Hasta 32 pases	[15]
Marsupial	Blastocisto 7 dpc	N.D.	[16]

Tabla 1.- ESCs de mamíferos no primates. Ratón (*Mus musculus*); vaca (*Bos taurus*); caballo (*Equus caballus*); hamster sirio (*Mesocricetus auratus*); marsupial Dunnart (*Sminthopsis macoura*); visón (*Mustela vison*); oveja (*Ovis aries*); cerdo (*Sus scrofa*); conejo (*Oryctolagus cuniculus*) y rata (*rattus norvegicus*).

Animal	Fuente de ESCs	Duración del cultivo	Referencias bibliográficas
Humano	División mórula blastocisto	>1 año	[17]
Mono	Blastocisto 8 dpo IVF/ICSI parthenote	>1 año	[18]

Tabla 2.- ESCs de mamíferos primates. Humano (*Homo sapiens*); Monos: Tití (*Callithrix jacchus*), mono cynomolgus (*Macaca fascicularis*) y mono reshus (*Macaca mulatta*).

Animal	Fuente de ESCs	Duración del cultivo	Referencias bibliográficas
Pollo	x blastodermo	35 pases	[19]
Zebrafish	Mid-blástula, anillo germinal	>30 pases	[8]
Medaka	Mid-blástula	18 meses	[20]
Dorada	Mid-blástula	>50 pases	[21]

Tabla 3.- ESCs de aves y peces. Aves: pollo (Gallus gallus); peces: Pez cebra (Danio rerio), medaka (Oryzias latipes) y dorada (Sparus aurata).

Células pluripotentes inducidas (iPSCs)

Generalidades de las iPSCs

El descubrimiento de las iPSCs surge gracias a la reprogramación de fibroblastos embrionarios de ratón a un estado indiferenciado semejante al de las células troncales embrionarias, gracias a la expresión de una combinación de genes: *OCT4 (Pou5f1), SOX2, KLF4* y *cMyc* [22]. Las iPSCs son células pluripotentes compatibles con el paciente que pueden ser utilizadas clínicamente para reemplazar las células muertas, dañadas e incluso genéticamente defectuosas sin la preocupación de que dichas células donantes sean rechazadas por el sistema inmune del paciente. Estas células también parecen pasar por alto las preocupaciones éticas en torno a la utilización de líneas de células troncales originadas a partir de embriones.

Resulta muy atractiva la posibilidad de crear fácilmente iPSCs de modelos animales importantes para la investigación biomédica, como el perro y el cerdo, en los que hasta la fecha, la generación de ESCs con las mismas características que las ESCs murinas, todavía supone un reto, así como la generación de iPSCs de especies en peligro de extinción y de especies desaparecidas [23,24].

Generación de iPSCs a partir de ungulados domésticos

iPSCs de cerdo

Se han generado con éxito líneas de iPSCs en cerdo, vaca, oveja y cabra. Las primeras iPSCs generadas en ganadería fueron de cerdo [25-27]. En todos los casos se reprogramaron fibroblastos con los factores de Yamanaka, ya sea empleando lentivirus o vectores retrovirales, con genes ya sean humanos o de ratón. Las colonias que se formaron tuvieron similitud morfológica con ESCs e iPSCs humanas y no coincidieron con la morfología de células troncales de ratón. Por lo tanto, las iPSCs de cerdo eran del epiblasto y no del tipo *naïve*. Esta propiedad también implica que las células poseen una de las principales deficiencias de las ESCs e iPSCs humanas al no poder individualizarse el cultivo celular durante su expansión *in vitro* sin provocar la diferenciación celular. Por lo tanto, el sistema de propagación es mediante grupos celulares, una característica que podría complicar la creación de quimeras, aunque ha habido publicaciones de producción de lechones quiméricos de esas líneas tipo epiblasto [28].

Las iPSCs porcinas aisladas por todos los grupos [25-29] eran claramente pluripotentes, como se evidencia por su capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares de las tres hojas embrionarias, ectodermo, endodermo y mesodermo, ya sea mediante la formación de cuerpos embrioides o bien de teratomas. La línea de porcino ID6 [26] se ha utilizado para generar células precursoras de la retina con capacidad para colonizar la retina [30], aunque todavía no se ha conseguido la diferenciación de células ID6 hacia linajes de endodermo o mesodermo empleando protocolos de diferenciación de ESCs humanas. Todavía no está claro si la expresión continua de genes de reprogramación dificulta la diferenciación dirigida hacia linajes específicos, o si bien los protocolos o los reactivos utilizados todavía no han sido optimizados para el cerdo.

iPSCs de oveja, cabra y vaca

Se han generado con éxito iPSCs a partir de células somáticas de ovino [31-34], caprino [35] y bovino [36-38]. Todas las líneas generadas pudieron diferenciarse a distintos tipos celulares representativos de las tres hojas embrionarias. Una línea ovina cumplió con el requisito final de pluripotencia, es decir, fue capaz de generar quimeras detectándose mediante PCR dos de los transgenes (*Pou5f1* y *c-Myc*) en corderos nacidos después de la transferencia de embriones [34]. Mientras que otra línea contribuyó a la ICM después de ser inyectadas en embriones tempranos [33].

Para la reprogramación de fibroblastos ovinos y caprinos se ha empleado la combinación estándar de genes de reprogramación humanos (*POU5F1, SOX2, KLF4, c-MYC*), salvo un grupo que utilizó los genes murinos [34]. Considerando las publicaciones referentes a reprogramación de células somáticas en ratón, es evidente que se pueden utilizar distintas combinaciones de genes con eficiencias variables, aunque *POU5F1* generalmente está incluido [29].

El éxito en la reprogramación de células somáticas de especie bovina se ha logrado mediante la inclusión de genes adicionales en la mezcla de reprogramación, p. ej. *Lin28 y Nanog* [36], o mediante la adición de sólo *NANOG* [38].

También hay dos publicaciones que han subrayado la importancia de emplear genes de la especie bovina en lugar de genes heterólogos, humanos o murinos, para mejorar la eficiencia

de reprogramación [36,37]. Y un grupo utilizó con éxito vectores plasmídicos en vez de virales [37]. La consideración de que para lograr una reprogramación eficiente de células en la especie bovina podría ser necesario el uso de secuencias de la misma especie es interesante, pero también hay que considerar que en el caso de las aves se ha conseguido una reprogramación de células somáticas empleando factores humanos [33], y en el caso de células de rana con factores de ratón [39].

Aplicaciones de las iPSCs

Aunque se han generado con éxito líneas de iPSCs de ungulados de granja, sus futuras aplicaciones en biotecnología y en biomedicina quedan aún por demostrar. La dirección futura dependerá en parte de la existencia de un compromiso de financiación por parte de organismos públicos de investigación o de empresas privadas del sector. Sin embargo, a corto plazo será esencial demostrar si las células iPSCs tienen ventajas frente a las células somáticas en las tecnologías de transgénesis: si su genoma es más fácilmente manipulable y si las iPSCs ofrecen una clonabilidad superior a las células somáticas (fibroblastos). Una segunda prioridad será demostrar que puede inducirse una diferenciación *in vitro* de las iPSCs de una manera reproducible. Este tipo de investigación es probable que requiera saber más sobre el proceso de reprogramación en sí, los requerimientos mínimos necesarios para establecer la pluripotencia y si las células conservan la memoria epigenética de sus progenitores. Lo más importante es que las líneas celulares no deberían expresar los genes de reprogramación utilizados para crearlas, ya que con toda probabilidad su expresión puede interferir con la diferenciación. Por último, no debemos asumir que los procedimientos y medios empleados para mantener ESCs humanas y murinas, especialmente los factores de crecimiento, sean necesariamente los óptimos para la generación de iPSCs de otras especies.

Usos clínicos de células troncales en medicina reproductiva

En la actualidad, no existe ningún uso generalizado de terapias basadas en células troncales en medicina reproductiva; sin embargo, su utilidad potencial les hace ser objeto de intensas investigaciones. En líneas generales, hay tres tipos de células troncales en las que se centra la investigación en medicina reproductiva: ESCs, iPSCs y células troncales espermatogónicas (SSCs). Desafortunadamente y a pesar del gran esfuerzo científico que se está llevando a cabo, no hay todavía ESCs o iPSCs completamente caracterizadas derivadas de otras especies que no sean primates y ratón [40]. Por este motivo, nos centraremos en las SSCs que se utilizan en las técnicas de xenotrasplante testicular y trasplante de SSCs.

Trasplante de células troncales espermatogónicas (SSCT)

El trasplante de SSCs (SSCT) se realizó por primera vez en ratón en 1994 [41]. Hasta la fecha esta metodología ha permitido producir esperma de jabalí [42], cabra [43], toro [44], mono cynomolgus [45], gato [46], así como de ratón y rata [47].

El procedimiento de trasplante consiste en colocar poblaciones enriquecidas en espermatogonias, o bien una mezcla de células germinales que incluyen espermatogonias, dentro de la luz de un túbulo seminífero del animal receptor. En modelos animales de gran tamaño se realiza mediante inyección a través de la *rete testis* con la ayuda de ultrasonidos.

El SSCT xenogénico, en el que el donante y el receptor son especies heterólogas, se ha realizado utilizando células germinales a partir de varias especies donantes: rata [48], perro, conejo [49], jabalí, toro, caballo [50,51] y gato [46], siendo el ratón el receptor habitual. Cuando el trasplante xenogénico se realiza entre especies estrechamente relacionadas (como de rata a ratón), se ha conseguido producir esperma [48]. Sin embargo, es evidente que a medida que se produce un distanciamiento filogenético entre donante y receptor, disminuye el éxito del procedimiento. En el caso de donante no roedor, las espermatogonias colonizan el túbulo seminífero del ratón pero se produce un fallo en la espermatogénesis [49,51]. Para superar esta limitación, puede emplearse como receptora la especie doméstica correspondiente a la misma familia taxonómica de la especie salvaje. En este sentido, se han usado por ejemplo gatos domésticos como receptores para SSCT xenogénica de felinos salvajes [46]. De igual manera, los estudios realizados utilizando como animal receptor el cerdo [42], la cabra [43], el toro [44] y primates no humanos [45], sugieren que las especies domesticadas pueden ser receptoras útiles para células de porcino en peligro de extinción, ungulados y primates, respectivamente.

Para maximizar el uso potencial de una especie como receptora para SSCT se deben realizar dos pasos. En primer lugar es necesario que el receptor tenga sus células troncales endógenas de la línea germinal deplecionadas para que las espermatogonias introducidas tengan un mayor acceso al nicho a lo largo de la membrana basal. Esta depleción se puede llevar a cabo mediante irradiación [52,53], quimioterapia [53,54] o isquemia fría [55]. El tratamiento mediante radiación es particularmente útil debido a que su aplicación es local (y no sistémica). Además, las células germinales son radiosensibles [56,57], a diferencia de las células de Sertoli y de Leydig que son radioresistentes [56,58]. Para la preparación del receptor de SSCT se han empleado con éxito varios protocolos de radiación [45,46].

El segundo requisito para un eficiente SSCT es la preparación de una suspensión de células germinales, incluyendo espermatogonias viables de los testículos de los donantes. Habitualmente, los protocolos de digestión enzimática utilizan un método de dos pasos: primero se separan los túbulos seminíferos de las células intersticiales con colagenasa y a continuación, se individualizan las células con tripsina [59]. Este método se puede modificar en función de las diferencias especie-específicas en relación a la cantidad de tejido conectivo [49]. Para maximizar el número y el rendimiento relativo del esperma derivado del donante, la población mixta de células germinales obtenida mediante la digestión enzimática debería enriquecerse en la población de SSCs para ser trasplantadas [60]. Existe un reto técnico a la hora de utilizar nuevas especies como donantes y es que el enriquecimiento depende normalmente del reconocimiento por parte del anticuerpo de los marcadores específicos de células troncales.

Una vez que se ha realizado el SSCT y antes de poder evaluar el éxito del trasplante, el receptor necesita un periodo adecuado de recuperación que permita múltiples ciclos espermatogénicos. La evaluación de la eficacia del trasplante también requiere de la cuantificación de los porcentajes relativos de espermatozoides producidos por el donante frente a los producidos por el receptor que pueden haber sobrevivido a la depleción. Esto también puede ser un reto porque los espermatozoides de especies relacionadas pueden ser morfológicamente indistinguibles. En estos casos, para confirmar el origen genético del gameto paterno, puede ser necesaria una PCR basada en el análisis de microsatélites de blastómeros individuales tomados de embriones producidos *in vitro*.

Aunque el SSCT está cargado de estos retos técnicos no triviales, el beneficio de la generación de una población auto-renovable de esperma viable resulta altamente atractivo. Además, la aplicación de esta metodología a especies raras es posible en un futuro cercano, especialmente en el caso de roedores en peligro de extinción, posiblemente compatibles con el ratón o la rata de laboratorio. Por ejemplo, para producir esperma viable de chinchilla de cola corta de América del Sur (*Chinchilla brevicaudata*) o de ratón de agua etíope (*Nilopegamys plumbeus*) se puede utilizar el SSCT en ratón o rata de laboratorio. Del mismo modo, también podrían beneficiarse algunas especies de peces, sobre todo porque la criopreservación de espermatozoides así como la congelación-descongelación de embriones es con frecuencia subóptima [61]. En salmónidos se llevó a cabo con éxito el trasplante de células germinales mediante la inyección de células germinales primordiales aisladas de trucha arco iris, en la cavidad peritoneal de los recién nacidos embriones de salmón [62,63].

Xenotrasplante testicular

El xenotrasplante testicular implica el injerto de pequeñas piezas (1-2 mm^3) de parénquima testicular de una especie, bajo la piel o la cápsula testicular de un ratón inmunodeficiente orquiectomizado. El tejido testicular puede proceder de una biopsia, puede tratarse de un testículo castrado o bien obtenerse a partir de un animal recientemente fallecido. A diferencia de la espermatogénesis *in vitro*, esta técnica tiene la ventaja de mantener la compleja arquitectura de los testículos. Las células intersticiales de Leydig pueden producir testosterona y todas las uniones intercelulares entre las células germinales así como las uniones entre las células germinales y las células de Sertoli se mantienen intactas.

Debido a que el ratón hospedador es inmunodeficiente, los xenoinjertos no son rechazados y se vuelven compatibles con el hospedador. Los xenotrasplantes se desarrollan y después de un período de tiempo específico de la especie, se producen los espermatozoides que pueden ser recuperados mediante la extirpación quirúrgica del xenoinjerto total o parcialmente [64]. El xenoinjerto testicular se ha llevado a cabo con éxito en ratones inmunodeficientes desnudos o en ratones con inmuno-deficiencia combinada severa (SCID) utilizando principalmente tejido testicular neonatal o juvenil temprano de ratón [64], de cerdo [42], de cabra [43], de hámster Djungarian, de tití [45], de toro [65], de conejo [66] y de gato [67]. Hasta la fecha, este tipo de xenoinjerto sólo ha tenido éxito utilizando tejido testicular de individuos inmaduros o de adultos reproductores estacionales (hámster Djungarian) que habían sido sometidos a un fotoperiodo de no cría para inducir la máxima regresión de la espermatogénesis [45].

Curiosamente, los xenoinjertos de tejido testicular prepuberal de mono Rhesus en receptores de ratón, aceleraron la maduración testicular y la producción de esperma competente más rápidamente que si el tejido testicular hubiera crecido normalmente en el donante [68]. Estas observaciones son prometedoras para que esta técnica sea útil en especies que requieren varios años para alcanzar la madurez sexual, como los elefantes. Sin una aceleración de la espermatogénesis, esta técnica no sería útil para cualquier especie en la que el tiempo transcurrido desde la donación hasta la fecha prevista de la pubertad fuese más largo que la vida útil de un ratón inmunodeficiente (aproximadamente 1.5 años). En cuanto a los usos potenciales en conservación, estos hallazgos sugieren que los xenoinjertos testiculares pueden ser capaces de producir espermatozoides maduros en los ratones receptores antes de lo normal.

A la inversa [67], demostraron que la finalización de la espermatogénesis en el tejido testicular xenoinjertado felino se retrasa hasta aproximadamente 50 semanas después de la cirugía, siendo el inicio común de la espermatogénesis en machos normales a las 20-28 semanas. Se ha confirmado un retraso de la espermatogénesis en xenoinjertos de testículo tanto en el gato doméstico como en el perro [46]. Sin embargo, en estas especies se produce esperma viable en los xenoinjertos. En conjunto, estas observaciones sugieren que el ratón inmunodeficiente puede ser un receptor capaz de soportar la espermatogénesis de especies muy diversas. Sin embargo, las diferencias entre el ratón hospedador y el tejido donante de distintas especies influirán en la cinética de la espermatogénesis y posiblemente, en el rendimiento en cuanto a la producción de esperma. Una línea importante de investigación consistiría en el estudio de la manipulación del nicho en el receptor para estimular la espermatogénesis del xenoinjerto.

Aunque técnicamente el xenoinjerto testicular es más fácil que el SSCT, también tiene algunas limitaciones importantes. En primer lugar, no puede haber maduración del epidídimo con esta técnica, por lo que el uso de esperma derivado de xenoinjertos para la cría debe ser a través de ICSI, técnica que nuevamente no está desarrollada en todas las especies, ya se trate de domésticas o salvajes. En segundo lugar, el hecho de que los xenoinjertos realizados procedan de tejido testicular neonatal o juvenil puede limitar la utilidad de la técnica en el manejo en cautividad, donde se dispone más fácilmente de testículos adultos. Por lo tanto, otra de las prioridades en investigación, para dar mayor relevancia a esta técnica en conservación, es el estudio de la viabilidad del xenoinjerto testicular de tejido adulto. Por último, el mantenimiento de una colonia de ratones inmunodeficientes es costoso y requiere cirugías en condiciones libres de patógenos. Por lo tanto, la mayoría de los zoológicos interesados en esta técnica probablemente tendrán que respaldarse de una universidad u otro centro de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. Evans M.J., *et al. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.* Nature 1981, 292: 154-6.
2. Martin G.R. *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells.* Proc Natl Acad Sci USA 1981, 78: 7634-8.
3. Solter D. *From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research.* Nat Rev Genet 2006, 7: 319-27.
4. Johnson M.H. *Mammalian development: axes in the egg?* Curr Biol 2001, 11: R281-4.
5. Rossant J. *Stem cells from the Mammalian blastocyst.* Stem Cells 2001, 19: 477-82.
6. Eyal-Giladi H., *et al. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology.* Dev Biol 1976, 49: 321-37.
7. Johnson M.H., *et al. Nomenclature of early development in mammals.* Reprod Fertil Dev 1996, 8: 759-64.
8. Fan L., *et al. Zebrafish embryo cells remain pluripotent and germ-line competent for multiple passages in culture.* Zebrafish 2004, 1:21-26.
9. Cao S., *et al.* Isolation *and culture of primary bovine embryonic stem cell colonies by a novel method.* J. Exp. Zool. 2009, 311A: 368-76.
10. Saito S., *et al. Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro.* FEBS Lett 2002, 531: 389-96.
11. Doetschman T., *et al. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells.* Dev Biol 1988, 127: 224-27.
12. Sukoyan M.A., *et al. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies.* Mol Reprod Dev 1993, 36: 148-58.
13. Prelle K., *et al. Pluripotent stem cells--model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy.* Anat Histol Embryol 2002, 31: 169-86.
14. Teramura T., *et al. Generation of embryonic stem cell lines from immature rabbit ovarian follicles.* Stem Cells Dev 2013, 22: 928-38.
15. Ruhnke M., *et al. Long-term culture and differentiation of rat embryonic stem cell-like cells into neuronal, glial, endothelial, and hepatic lineages.* Stem Cells 2003, 21: 428-36.
16. Yousef A., *et al. The type and differentiation of cells in vitro from unilaminar and bilaminar blastocysts of two marsupials, Antechinus stuartii and Sminthopsis macroura.* Reprod Fertil Dev 1996, 8: 743-52.
17. Carpenter M.K., *et al. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells.* Cloning Stem Cells 2003, 5: 79-88.
18. Wolf D.P., *et al. Progress with nonhuman primate embryonic stem cells.* Biol Reprod 2004, 71: 1766-71.
19. Petitte J.N., *et al. Avian pluripotent stem cells.* Mech Dev 2004, 121: 1159-68.
20. Hong Y., *et al. Retention of the developmental pluripotency in medaka embryonic stem cells after gene transfer and long-term drug selection for gene targeting in fish.* Transgenic Res 2004, 13: 41-50.
21. Bejar J., *et al. An ES-like cell line from the marine fish Sparus aurata: characterization and chimaera production.* Transgenic Res 2002, 11: 279-89.
22. Takahashi K *et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.* Cell 2006, 126: 663-76.
23. Roberts R.M., *et al. Induced pluripotent stem cells from swine (Sus scrofa): why they may prove to be important.* Cell Cycle 2009, 8: 3078-81.
24. Telugu B.P., *et al. The promise of stem cell research in pigs and other ungulate species.* Stem Cell Rev 2010, 6: 31-41.
25. Esteban M.A., *et al. Generation of induced pluripotent stem cell lines from Tibetan miniature pig.* J Biol Chem 2009, 284: 17634-40.
26. Ezashi T., *et al. Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells.* Proc Natl Acad Sci USA 2009, 106: 10993-8.
27. Wu Z., *et al. Generation of pig induced pluripotent stem cells with a drug-inducible system.* J Mol Cell Biol 2009, 1: 46-54.
28. West F.D., *et al. Porcine induced pluripotent stem cells produce chimeric offspring.* Stem Cells Dev 2010, 19: 1211-20.
29. Montserrat N., *et al. Generation of feeder-free pig induced pluripotent stem cells without Pou5f1.* Cell Transplant 2012, 21: 815-25.
30. Zhou L., *et al. Differentiation of induced pluripotent stem cells of swine into rod photoreceptors and their integration into the retina.* Stem Cells 2011, 29: 972-80.
31. Bao L., *et al. Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors.* Cell Res 2011, 21: 600-8.
32. Li Y., *et al. Reprogramming of sheep fibroblasts into pluripotency under a drug-inducible expression of mouse-derived defined factors.* PLoS One 2011, 6: e15947.
33. Liu J., *et al. Generation and characterization of reprogrammed sheep induced pluripotent stem cells.* Theriogenology 2012, 77(2): 338-46.
34. Sartori C., *et al. Ovine-induced pluripotent stem cells can contribute to chimeric lambs.* Cell Reprogram 2012, 14: 8-19.
35. Ren J., *et al. Generation of hircine-induced pluripotent stem cells by somatic cell reprogramming.* Cell Res 2011, 21: 849-53.
36. Han X., *et al. Generation of induced pluripotent stem cells from bovine embryonic fibroblast cells.* Cell Res 2011, 21: 1509-12.
37. Huang B., *et al. A virus-free poly-promoter vector induces pluripotency in quiescent bovine cells under chemically defined conditions of dual kinase inhibition.* PLoS One 2011, 6: e24501.
38. Sumer H., *et al. NANOG is a key factor for induction of pluripotency in bovine adult fibroblasts.* J Anim Sci 2011, 89: 2708-16.
39. Vivien C., *et al. Non-viral expression of mouse Oct4, Sox2, and Klf4 transcription factors efficiently reprograms tadpole muscle fibers in vivo.* J Biol Chem 2012, 287: 7427-35.
40. Muñoz M., *et al. Constraints to progress in embryonic stem cells from domestic species.* Stem Cell Rev 2009, 5: 6-9.
41. Brinster R.L., *et al. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation.* Proc Natl Acad Sci U S A 1994, 91: 11298-302.
42. Honaramooz A., *et al. Germ cell transplantation in pigs.* Biol Reprod 2002, 66: 21-8.
43. Honaramooz A., *et al. Germ cell transplantation in goats.* Mol Reprod Dev 2003, 64: 422-8.
44. Izadyar F., *et al. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells.* Reproduction 2003, 126: 765-74.
45. Schlatt S., *et al. Germ cell transplantation into X-irradiated monkey testes.* Hum Reprod 2002, 17: 55-62.

46. Kim Y., *et al. Recipient preparation and mixed germ cell isolation for spermatogonial stem cell transplantation in domestic cats.* J Androl 2006, 27: 248-56.
47. Zhang Z., *et al. Successful intra- and interspecific male germ cell transplantation in the rat.* Biol Reprod 2003, 68: 961-7.
48. Clouthier D.E., *et al.* Nature 1996, 381: 418-21.
49. Dobrinski I., *et al. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes.* Biol Reprod 1999, 61: 1331-9.
50. Dobrinski I., *et al. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes.* Mol Reprod Dev 2000, 57:270-9.
51. Nagano M., *et al. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes.* Biol Reprod 2001, 64: 1409-16.
52. Meistrich M.L., *et al. Gradual regeneration of mouse testicular stem cells after exposure to ionizing radiation.* Radiat Res 1978, 74: 349-62.
53. Ogawa T., *et al. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules.* Int J Dev Biol 1997, 41: 111-22.
54. Brinster C.J., *et al. Restoration of fertility by germ cell transplantation requires effective recipient preparation.* Biol Reprod 2003, 69: 412-20.
55. Young G.P., *et al. Sertoli cell-only syndrome produced by cold testicular ischemia.* Endocrinology 1988, 122: 1074-82.
56. Dym M., *et al. Role of spermatogonia in the repair of the seminiferous epithelium following x-irradiation of the rat testis.* Am J Anat 1970, 128: 265-82.
57. Huckins C. *The morphology and kinetics of spermatogonial degeneration in normal adult rats: an analysis using a simplified classification of the germinal epithelium.* Anat Rec 1978, 190: 905-26.
58. Joshi D.S., *et al. Stage-dependent variation in the radiosensitivity of DNA in developing male germ cells.* Radiat Res 1990, 121: 274-81.
59. Bellve A.R., *et al. Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells.* J Histochem Cytochem 1977, 25: 480-94.
60. Shinohara T., *et al. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells.* Proc Natl Acad Sci USA 2000, 97: 8346-51.
61. Rana K.J. *Cryopreservation of fish spermatozoa.* Methods Mol Biol 1995, 38: 151-65.
62. Takeuchi Y., *et al. Biotechnology: surrogate broodstock produces salmonids.* Nature 2004, 430: 629-30.
63. Yoshizaki G., *et al. Green fluorescent protein labeling of primordial germ cells using a nontransgenic method and its application for germ cell transplantation in salmonidae.* Biol Reprod 2005, 73: 88-93.
64. Honaramooz A., *et al. Sperm from neonatal mammalian testes grafted in mice.* Nature 2002, 418: 778-81.
65. Oatley J.M., *et al. Establishment of spermatogenesis in neonatal bovine testicular tissue following ectopic xenografting varies with donor age.* Biol Reprod 2005, 72: 358-64.
66. Shinohara T., *et al. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and in-vitro microinsemination.* Hum Reprod 2002, 17: 3039-45.
67. Snedaker A.K., *et al. A game of cat and mouse: xenografting of testis tissue from domestic kittens results in complete cat spermatogenesis in a mouse host.* J Androl 2004, 25: 926-30.
68. Honaramooz A., *et al. Accelerated maturation of primate testis by xenografting into mice.* Biol Reprod 2004, 70: 1500-3.

El coste de la inmortalidad: Alteraciones genéticas y epigenéticas de las ESCs e iPSCs

P. Ramos-Ibeas, E. Pericuesta, Á. Patricia López-Cardona, R. Laguna-Barraza, N. Fonseca-Balvís, R. Fernández González, A. Gutiérrez-Adán
Departamento de Reproducción Animal, INIA

Introducción

Las células madre embrionarias (ESCs) y las células pluripotentes inducidas (iPSCs) constituyen hoy en día una importante herramienta para la medicina regenerativa y la creación de animales transgénicos. Desde que las ESCs fueron aisladas por primera vez en el ratón hace más de 30 años [1], se ha producido un enorme desarrollo de las técnicas para su aislamiento, crecimiento, manipulación genética y diferenciación hacia multitud de linajes celulares. Sin embargo, todos estos procedimientos conllevan un cultivo *in vitro* prolongado, lo que ha llevado a los científicos a preocuparse por la estabilidad de estas líneas celulares y a estudiar sus posibles alteraciones genéticas y epigenéticas. Estos estudios han revelado que ciertas alteraciones pueden proceder del cultivo *in vitro* de los embriones utilizados para obtener las líneas de ESCs, producirse durante la reprogramación de las células somáticas en el caso de las iPSCs, o bien aparecer durante el mantenimiento en cultivo. Además, dichas alteraciones están asociadas al desarrollo de varias enfermedades o síndromes, y pueden llevar a la transformación oncogénica de las células, lo que compromete la seguridad de las terapias de medicina regenerativa con células pluripotentes.

Las modificaciones epigenéticas

Las modificaciones epigenéticas son aquellos cambios que puede sufrir la cromatina que modifican la expresión génica sin que se vea afectada la secuencia de nucleótidos. Esto se consigue principalmente mediante dos mecanismos: la metilación del ADN, que consiste en la adición de un grupo metilo en el carbono 5 de las citosinas en ciertas regiones de genoma conocidas como islas CpG, y las modificaciones en las histonas, que comprenden la metilación, acetilación o fosforilación de la región N-terminal de dichas proteínas. En la mayoría de los casos, la hipermetilación del ADN en la región promotora de un gen silencia su expresión, mientras que la hipometilación la activa. Las principales enzimas responsables de la regulación de la metilación del ADN son las ADN metil-transferasas (*Dnmt*), siendo *Dnmt1* la responsable del mantenimiento de la metilación, y *Dnmt3a* y *Dnmt3b* las encargadas de la metilación *de novo*. Algunos de los mecanismos más importantes regulados epigenéticamente son la inactivación del cromosoma X y el *imprinting*.

El *imprinting* permite que determinados genes se expresen sólo a partir de uno de los alelos: el materno o el paterno, mediante la metilación del ADN en las regiones diferencialmente metiladas (DMR) del genoma. Durante el desarrollo fetal tiene lugar una reprogramación epigenética que permite borrar estas marcas de metilación en las células primordiales germinales, que serán reestablecidas posteriormente durante la gametogénesis para que se transmitan a la siguiente generación de manera específica en función del sexo [2].

La inactivación del cromosoma X es otro mecanismo regulado epigenéticamente por el que uno de los dos cromosomas X se inactiva en las hembras durante la embriogénesis para que los genes que se encuentran en este cromosoma se expresen de igual manera en ambos sexos [3].

Las alteraciones en la inactivación del cromosoma X y en el *imprinting* producen patologías como el desarrollo de tumores [4-6] y síndromes relacionados con el crecimiento y el comportamiento [7,8].

Inestabilidad epigenética en ESCs e iPSCs

Inestabilidad epigenética procedente del embrión o de la célula de origen

La obtención de líneas de ESCs implica la manipulación y el cultivo *in vitro* de blastocistos. Estos embriones se encuentran en un estadio de desarrollo epigenéticamente dinámico y muy sensible a los cambios ambientales, y al ser manipulados y sometidos a condiciones de cultivo no fisiológicas, pueden

producirse alteraciones epigenéticas que persistan durante la edad adulta y se traduzcan en problemas de salud como obesidad, infertilidad o alteraciones del comportamiento y del crecimiento [9,10]. Esto es especialmente preocupante en humanos, ya que debido a la legislación vigente y a cuestiones éticas, todas las líneas de ESCs se generan a partir de embriones producidos *in vitro* en las clínicas de infertilidad y donados al no ser apropiados para ser transferidos.

Se ha demostrado que el cultivo *in vitro* de los embriones puede producir alteraciones en el *imprinting*, resultando en la expresión bialélica de algunos genes como *H19*, *Igf2* e *Igf2r* [11-13]. Estas alteraciones se transmiten a las líneas de ESCs, y en algunos casos el cultivo continuado puede hacer que se corrijan [14]; sin embargo, otros estudios indican que se mantienen tras la diferenciación y dan lugar a patrones de expresión génica aberrantes [15]. Muchos de los genes de *imprinting* se encargan de regular el crecimiento y la proliferación celular, por lo que su alteración podría dar lugar a la aparición de tumores [16].

Durante la reprogramación de células somáticas hacia iPSCs, la cromatina debe ser reorganizada para adoptar un estado similar al de las ESCs, y los genes relacionados con pluripotencia necesitan ser reactivados mediante la desmetilación del ADN [17]. Sin embargo, algunos estudios han sugerido que las iPSCs retienen una memoria epigenética de la célula de la que proceden, ya que mantienen la expresión de algunos transcritos de la célula original. Esto se ha asociado con cierta variabilidad entre líneas en cuanto a su capacidad de diferenciación [18,19]. También se ha observado que los patrones de metilación de las DMRs en iPSCs son diferentes a los de las ESCs, y que a su vez es muy variable entre diferentes líneas de iPSCs [18]. Además, algunas líneas de iPSCs muestran un silenciamiento aberrante del locus *Dlk1-Dio3*, que codifica genes de *imprinting*, y esto está relacionado con una menor capacidad de contribución a la formación de animales quiméricos cuando son transferidas a embriones hospedadores [20]. Cuando los análisis epigenéticos se extienden a las modificaciones de histonas, las diferencias entre líneas de iPSC generadas a partir de diferentes tipos celulares son más obvias. Sin embargo, estas diferencias se borran a lo largo de repetidos pases durante el cultivo a largo plazo, aunque el silenciamiento del cluster *Dlk1-Dio3* no se ve modificado por el número de pases, lo que sugiere que no todas las modificaciones epigenéticas pueden ser restauradas [19] (ver Figura 1).

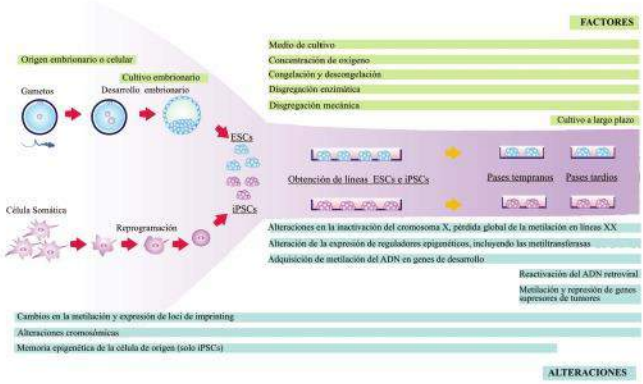


Figura 1.- Alteraciones genéticas y epigenéticas de las ESCs e iPSCs. Diversos factores pueden desencadenar la aparición de alteraciones en diferentes momentos del proceso de obtención de líneas de ESCs y de iPSCs.

Inestabilidad epigenética derivada del mantenimiento en cultivo de las ESCs e iPSCs

Una vez establecidas, las líneas de ESCs pueden ser mantenidas en cultivo durante periodos indefinidos; no obstante, esto hace que pierdan su pluripotencia [21] debido a la aparición de alteraciones epigenéticas como modificaciones en la metilación de los genes de *imprinting* [14,22,23]. En ESCs humanas se ha descrito que el cultivo prolongado afecta a la metilación de la región promotora de genes oncosupresores [24]. Otros estudios indican que el ADN retroviral que se introduce en las ESCs y que es previamente silenciado, puede volver a ser reactivado por una pérdida de metilación en función a las condiciones de cultivo [25,26] (ver Figura 1).

Estos cambios son impredecibles y variables entre líneas celulares, y una vez establecidos, pueden ser permanentes y ser transmitidos a las células diferenciadas [27] o a los animales quiméricos producidos a partir de ellas. En concreto, en nuestro laboratorio pudimos observar que una línea de ESCs en pases tardíos perdió la capacidad de transmitir a linaje germinal y comenzó a producir un fenotipo de cola torcida en los animales quiméricos producidos a partir de ella, debido a una alteración en los patrones de metilación y en la expresión de ciertos retrotransposones [28] (ver Figura 2).

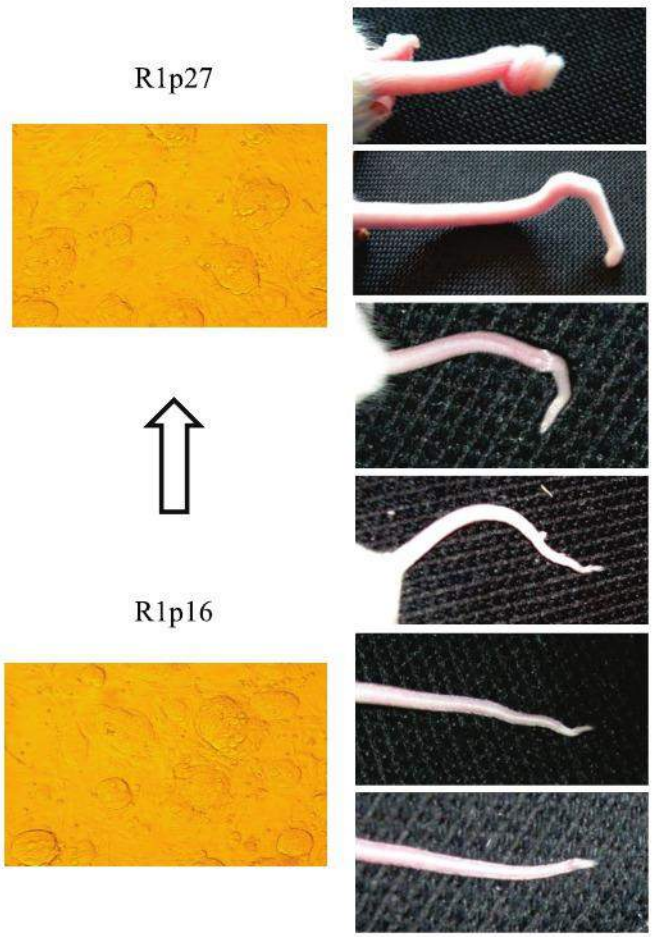


Figura 2.- Fenotipo de cola torcida observado en ratones quiméricos producidos a partir de una línea de ESCs de pase tardío.

Sin embargo, hasta ahora no se han descrito cuáles serían las condiciones de cultivo óptimas para favorecer la estabilidad epigenética.

En el epiblasto temprano del blastocisto ambos cromosomas X se encuentran aún activos en las hembras, por lo que cabría esperar la misma situación para las células ES obtenidas a partir de estos embriones. Sin embargo, se ha encontrado gran variabilidad entre líneas celulares, sobre todo en las ESCs humanas [29]. Las condiciones de cultivo pueden afectar a la inactivación del cromosoma X, ya que cambios en la concentración de oxígeno pueden promover su inactivación [30], así como otros estímulos estresantes como la congelación y la descongelación [27]. Por otra parte, algunas líneas XX muestran una pérdida global de metilación del ADN, posiblemente asociada con el hecho de que sus dos cromosomas X se encuentran activos. Todo esto hace que las líneas XX sean más inestables en cultivo que las XY, por lo que en investigación las líneas XY suelen ser más utilizadas [31,32] (ver Figura 1).

Inestabilidad genética en ESCs e iPSCs

Como en el caso de las alteraciones epigenéticas, el origen de las ESCs o de las iPSCs puede ser el causante de las alteraciones cromosómicas presentes en pases tempranos. Se han observado diploidías en un *cassette* de 42 genes en 15 líneas de ESCs de mono Rhesus, además de traslocaciones en tres de las líneas. El hecho de que estas anormalidades se encontrasen en pases tempranos, sugiere que posiblemente provengan de los embriones de origen [33] o de las células germinales que participaron en la formación del cigoto [34].

Igualmente, se ha observado que un cultivo prolongado de las ESCs puede traer como consecuencia alteraciones genéticas de las mismas. Así se han descrito con una elevada frecuencia anormalidades en el cariotipo de ESCs humanas mantenidas largos periodos de tiempo en cultivo, principalmente ganancia en los cromosomas 12 y 17, y con menos frecuencia en el X. Estas observaciones se extienden a otros tipos celulares como las células tumorales de la línea germinal o las iPSCs humanas, siendo la trisomía del cromosoma 12 la anormalidad más observada (42.6% en hESCs y el 32.9% en hiPSCs). Mediante una iniciativa a nivel mundial de estudio de cariotipos en células ES humanas se observó que la mayoría de anormalidades cromosómicas presentaban una distribución de mosaico, y se confirmó que las principales anormalidades se daban en los cromosomas 1, 12, 17 y 20 [27].

Al emplear técnicas más resolutivas como la comparación múltiple de *arrays* genómicos de hibridación en ESCs e iPSCs humanas, se observaron algunas variaciones en el número de copias de diferentes líneas celulares, siendo la amplificación del locus 20q11.21 la más frecuente [35,36]. También se han observado otras variaciones asociadas a genes de pluripotencia como duplicaciones en el locus del pseudogen 1 NANOG (*NANOGGP1*) [37], la amplificación del factor de transcripción asociado a SRY (SOX2), la transformación del factor de crecimiento β (*TGFβ*), los factores 1 y 2 de determinación de señalización de izquierda-derecha (*LEFTY1 y LEFTY2*) y la amplificación del oncogen humano *MYC* [24] [38], siendo este último, junto con SOX2, dos factores de reprogramación utilizados comúnmente en la generación de iPSCs.

A pesar de que actualmente no se conoce la causa exacta de estas alteraciones cromosómicas, existen estudios que han analizado la integridad genómica a distintos pases y sometiendo a las células a distintas condiciones y técnicas de cultivo. Así la

disgregación enzimática mediante tripsina en ESCs humanas genera aneuploidías en los cromosomas 12 y 17 y a veces copias extra de los cromosomas 14, 20 y X, frente a la disgregación mecánica que no genera ninguna; mientras que otros estudios reportan aberraciones genéticas tras la disgregación mecánica [39,40], pero no tras la enzimática [41]. Otros autores sugieren que las alteraciones pueden ser consecuencia de los procesos de congelación y descongelación de las células [4] (ver Figura 1).

El coste de la inmortalidad: consecuencias de estas alteraciones

Las líneas de células pluripotentes con alteraciones genéticas y epigenéticas muestran bastante similitud con las células cancerosas, y estas alteraciones frecuentemente afectan a las mismas regiones del genoma en ambos tipos celulares [42]. Se ha descrito que las líneas de ESCs con anormalidades cariotípicas pueden sufrir una transformación maligna tras ser trasplantadas en ratones [43-46]. Además, la trisomía del cromosoma 12, la alteración genética más común de las células pluripotentes, es utilizada también como diagnóstico de tumores de células germinales [43] y es una de las alteraciones más comunes en la leucemia linfocítica crónica [47]. Por otra parte, la amplificación de MYC que tiene lugar en ESCs es también común en procesos cancerosos [24,38]. Las alteraciones epigenéticas como la inestabilidad en el *imprinting*, en la XCI y en la metilación del ADN, en especial en regiones del genoma donde se encuentran genes oncosupresores, también pueden llevar a la aparición de tumores en el caso de utilizar estas líneas celulares para posteriores aplicaciones [4]. Por ejemplo, se ha descrito la aparición de cáncer diseminado por todo el organismo en ratones quiméricos producidos a partir de ESCs con una pérdida global de metilación en genes de *imprinting* [48]. En varias especies animales, las alteraciones epigenéticas que afectan a genes de *imprinting* pueden dar lugar a sobrecrecimiento fetal [12], y en humanos a enfermedades como el síndrome de Angelman [49] o el de Beckwith-Wiedemann [50]. Además, el estado de hipometilación general en el genoma está asociado con esquizofrenia [51] y con el síndrome ICF (inmunodeficiencia, inestabilidad centromérica, anomalías faciales) [52], además de con la aparición de tumores.

Por último, las alteraciones producidas en las líneas de ESCs derivadas de un cultivo *in vitro* prolongado pueden producir anomalías y muerte postnatal en los animales quiméricos producidos a partir de ellas [21].

Un aspecto interesante de estas alteraciones es que los cromosomas que se ven más afectados durante el cultivo de ESCs o iPSCs, contienen genes relacionados con la autorrenovación y la diferenciación celular (*NANOG*, *STELLAR*, *GDF3*, *GRB2* y *STAT3*), favoreciendo el potencial celular en cultivo en el caso de las líneas de ESCs donde existen copias extra de estos cromosomas [53,54]. La amplificación del locus 20q11.21 podría suponer también una adaptación al cultivo de las células pluripotentes [55], además de la ganancia en el cromosoma 17, que contiene numerosos genes inhibidores de apoptosis [56]. Sin embargo, existen pocos estudios que hayan descrito estos fenómenos, y la variabilidad en los métodos de cultivo utilizados dificulta la comparación de sus resultados [57].

Conclusión

Múltiples estudios han demostrado que las ESCs e iPSCs pueden tener alteraciones genéticas y epigenéticas que pueden proceder de su origen embrionario o celular, estar relacionadas con el sexo o bien producirse por las condiciones de cultivo o por un cultivo *in vitro* prolongado. Por ello, antes de la utilización de estas líneas celulares para la producción de animales quiméricos o para aplicaciones terapéuticas, deberían llevarse a cabo estudios genéticos y epigenéticos centrados en genes de *imprinting* o relacionados con el crecimiento, el cáncer y la inactivación del cromosoma X. En los últimos años se han desarrollado técnicas rápidas y eficaces de secuenciación del genoma, además de ensayos *in vitro* como la formación de teratomas, que podrían ser adoptadas para este fin. Por último, sería de vital importancia desarrollar métodos de cultivo que aseguren la estabilidad genética y epigenética a largo plazo de las líneas celulares, o establecer un límite en el número de pases para su utilización.

BIBLIOGRAFÍA

1. Evans M.J., *et al. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.* Nature 1981, 292: 154-6.
2. Allegrucci C., *et al. Epigenetics and the germline.* Reproduction 2005, 129(2): 137-49.
3. Lyon M.F. *Gene action in the X-chromosome of the mouse (Mus musculus L.).* Nature 1961, 190: 372-3.
4. Gordeeva O.F., *et al. Pluripotent stem cells: maintenance of genetic and epigenetic stability and prospects of cell technologies.* Ontogenez 2008, 39(6): 405-19.
5. Cui H., *et al. Loss of imprinting in colorectal cancer linked to hypomethylation of H19 and IGF2.* Cancer Res 2002, 62(22): 6442-6.
6. Feinberg A.P., *et al. The history of cancer epigenetics.* Nat Rev Cancer 2004, 4(2): 143-53.
7. Clayton-Smith J. *Genomic imprinting as a cause of disease: Is increasingly recognised, especially after assisted reproduction.* BMJ 2003, 327(7424): 1121-2.
8. Chen Z., *et al. Large offspring syndrome: a bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann.* Epigenetics 2013, 8(6): 591-601.
9. Fernandez-Gonzalez R., *et al. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring.* Biol Reprod 2008, 78(4): 761-72.
10. Calle A., *et al. Male mice produced by in vitro culture have reduced fertility and transmit organomegaly and glucose intolerance to their male offspring.* Biol Reprod 2012, 87(2): 34.
11. Fernandez-Gonzalez R., *et al. Long-term effect of in vitro culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior.* Proc Natl Acad Sci USA 2004, 101(16): 5880-5.

12. Young L.E., *et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture.* Nat Genet 2001, 27(2): 153-4.
13. Mann M.R., *et al. Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture.* Development 2004, 131(15): 3727-35.
14. Horii T., *et al. Epigenetic differences between embryonic stem cells generated from blastocysts developed in vitro and in vivo.* Cell Reprogram 2010, 12(5): 551-63.
15. Feinberg A.P., *et al. The epigenetic progenitor origin of human cancer.* Nat Rev Genet 2006, 7(1): 21-33.
16. Morison I.M., *et al. A census of mammalian imprinting.* Trends Genet 2005, 21(8): 457-65.
17. Mattout A., *et al. Global epigenetic changes during somatic cell reprogramming to iPS cells.* J Mol Cell Biol 2011, 3(6): 341-50.
18. Kim K., *et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells.* Nature 2010, 467: 285-90.
19. Polo J.M., *et al. Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells.* Nat Biotechnol 2010, 28(8): 848-55.
20. Stadtfeld M., *et al. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells.* Nature 2010, 465: 175-81.
21. Nagy A., *et al. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse.* Development 1990, 110(3): 815-21.
22. Rugg-Gunn P.J., *et al. Epigenetic status of human embryonic stem cells.* Nat Genet 2005, 37(6): 585-7.
23. Fujimoto A., *et al. Development of a monkey model for the study of primate genomic imprinting.* Mol Hum Reprod 2005, 11(6): 413-22.
24. Maitra A., *et al. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells.* Nat Genet 2005, 37(10): 1099-103.
25. Minoguchi S., *et al. Instability of retroviral DNA methylation in embryonic stem cells.* Stem Cells 2008, 26(5): 1166-73.
26. Allegrucci C., *et al. Restriction landmark genome scanning identifies culture-induced DNA methylation instability in the human embryonic stem cell epigenome.* Hum Mol Genet 2007, 16(10): 1253-68.
27. Lund R.J., *et al. Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells.* Nat Rev Genet 2012, 13(10): 732-44.
28. Ramirez M.A., et al. *Transcriptional and post-transcriptional regulation of retrotransposons IAP and MuERV-L affect pluripotency of mice ES cells.* Reprod Biol Endocrinol 2006, 4: 55.
29. Bermejo-Alvarez P., *et al. Solving the "X" in embryos and stem cells.* Stem Cells Dev 2012, 21(8): 1215-24.
30. Lengner C.J., *et al. Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations.* Cell 2010, 141(5): 872-83.
31. Pannetier M., *et al. Epigenetic stability of embryonic stem cells and developmental potential.* Trends Biotechnol 2007, 25(12): 556-62.
32. Zvetkova I., *et al. Global hypomethylation of the genome in XX embryonic stem cells.* Nat Genet 2005, 37(11): 1274-9.
33. Mitalipov S., *et al.* Isolation and characterization of novel rhesus monkey embryonic stem cell lines. Stem Cells 2006, 24(10): 2177-86.
34. Revazova E.S., *et al. Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts.* Cloning Stem Cells 2007, 9(3): 432-49.
35. Martins-Taylor K., *et al. Recurrent copy number variations in human induced pluripotent stem cells.* Nat Biotechnol 2011, 29: 488-91.
36. Lefort N., *et al. Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21.* Nat Biotechnol 2008, 26(12): 1364-6.
37. Laurent L.C., *et al. Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture.* Cell Stem Cell 2011, 8(1): 106-18.
38. Spits C., *et al. Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells.* Nat Biotechnol 2008, 26(12): 1361-3.
39. Buzzard J.J., *et al. Karyotype of human ES cells during extended culture.* Nat Biotechnol 2004, (22): 381-2.
40. Caisander G., *et al. Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines after prolonged in vitro culture.* Chromosome Res 2006, 14(2): 131-7.
41. Thomson A., *et al. Human embryonic stem cells passaged using enzymatic methods retain a normal karyotype and express CD30.* Cloning Stem Cells 2008, 10(1): 89-106.
42. Meissner A. *Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells.* Nat Biotechnol 2010, 28(10): 1079-88.
43. Harrison N.J., *et al. Culture adaptation of embryonic stem cells echoes germ cell malignancy.* Int J Androl 2007, 30(4): 275-81.
44. Werbowetski-Ogilvie T.E., *et al. Characterization of human embryonic stem cells with features of neoplastic progression.* Nat Biotechnol 2009, 27(1): 91-7.
45. Yang S., *et al. Tumor progression of culture-adapted human embryonic stem cells during long-term culture.* Genes Chromosomes Cancer 2008, 47(8): 665-79.
46. Moon S.H., *et al. Effect of chromosome instability on the maintenance and differentiation of human embryonic stem cells in vitro and in vivo.* Stem Cell Res 2011, 6(1): 50-9.
47. Anastasi J., *et al. Detection of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization to interphase cells: a simple and sensitive method.* Blood 1992, 79(7): 1796-801.
48. Holm T.M., *et al. Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice.* Cancer Cell 2005, 8(4): 275-85.
49. Cox G.F., *et al. Intracytoplasmic Sperm Injection May Increase the Risk of Imprinting Defects.* Am J Hum Genet 2002, 71(1): 162-4.
50. DeBaun M.R., *et al. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19.* Am J Hum Genet 2003, 72(1): 156-60.
51. Shimabukuro M., *et al. Global hypomethylation of peripheral leukocyte DNA in male patients with schizophrenia: a potential link between epigenetics and schizophrenia.* J Psychiatr Res 2007, 41(12): 1042-6.
52. Jeanpierre M., *et al. An embryonic-like methylation pattern of classical satellite DNA is observed in ICF syndrome.* Hum Mol Genet 1993, 2(6): 731-5.
53. Burdon T., *et al. Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells.* Trends Cell Biol 2002, 12(9): 432-8.
54. Clark A.T., *et al. Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma.* Stem Cells 2004, 22(2): 169-79.
55. Amps K., *et al. Screening ethnically diverse human embryonic stem cells identifies a chromosome 20 minimal amplicon conferring growth advantage.* Nat Biotechnol 2011, 29(12): 1132-44.
56. Draper J.S., *et al. Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells.* Nat Biotechnol 2004, 22(1): 53-4.
57. Pera M.F., *et al. Extrinsic regulation of pluripotent stem cells.* Nature 2010, 465: 713-20.

Granja San Bernardo

Minimal Disease Level Rabbits

New Zeeland White Rabbit.
Total absence of all important rabbit disease germens with specific sanitary garantees.

Ask our most recent garantee table at
www.granjasanbernardo.com

Emociones, trabajo y resultados

Javier Fidalgo
Socio-director en Ocelata consultores

La aceptación de las emociones en el mundo empresarial

Durante la mayor parte de la primera mitad del siglo XX, el uso de las emociones como un recurso práctico para trabajar se concentraba en la práctica del psicoanálisis. Los psicoanalistas y psicoterapeutas usan las emociones propias y del paciente como fuente de información en su objetivo de ayudarle a mejorar.

Aunque a mediados de los años 50 del pasado siglo, la *Tavistock*, una institución inglesa, ya usaba las emociones como recurso para ayudar a organizaciones, directivos y equipos, a mejorar en su práctica laboral, lo cierto es que esta aproximación emocional a las organizaciones y el trabajo era una rareza.

En cuanto a la investigación moderna sobre la relación entre emociones y trabajo, parece ser que se inició en 1983 con la publicación del libro de Hochschild, The Managed Heart[1].

Aún en la década de los 90 del siglo XX, las emociones y su influencia en nuestro comportamiento seguían ocultas a la opinión pública y la gestión empresarial. Se consideraba, aún se hace en muchos lugares, que las emociones eran un estorbo para el mejor ejercicio de una gestión inteligente y exitosa. Pero a mediados de los '90, se publicaron dos libros que contribuyeron a cambiar esta situación.

Desde la neurología, el celebérrimo Antonio Damasio, publicó *El Error de Descartes*. Sirvió para divulgar los resultados de sus investigaciones, entre ellos la idea de que las emociones lejos de oponerse a nuestra inteligencia nos hacen racionales. Su papel es fundamental para comportarnos de forma inteligente. Mucho más impacto social tuvo el libro de Daniel Goleman, *Inteligencia Emocional*. Se convirtió en un *bestseller* mundial hablando de la influencia de las emociones en nuestro comportamiento e inteligencia. De pronto las emociones eran algo a tener muy en cuenta en nuestra felicidad. Resultó que los test de inteligencia no eran la última palabra al respecto de las posibilidades de éxito profesional. Las emociones eran mucho más importantes de lo que habíamos pensado.

Hoy parece aceptado que las emociones son fundamentales en nuestra **inteligencia práctica**, y que su consciencia y manejo nos hacen aún más inteligentes (si alguien quiere saber cómo de inteligente es aquel que logra "desprenderse" de las emociones, puede leer los tres primeros capítulos del libro de Damasio[2]). Desde entonces, se ha generado una creciente producción investigadora. Y lo que, desde el punto de vista de la gestión empresarial, es más interesante, ya se habla de emociones en las revistas *Fortune y Time*, hay cientos de artículos en la *Harvard Business Review*, y se han incluido, como dimensión para liderar, en los MBA de prestigiosas universidades y escuelas de negocios.

Desde esa perspectiva empresarial, las emociones y su manejo han pasado de no existir por indeseables, a considerarse un factor fundamental de éxito en este contexto globalizado competitivo moderno. Ya ha comenzado a considerarse la competencia emocional como algo esencial del directivo si quiere ejercer un liderazgo exitoso (*la competencia emocional* se refiere a la capacidad de ser consciente de las propias emociones y las del equipo, comprenderlas y manejarlas en aras de crear un entorno emocional suficientemente bueno que facilite el trabajo encomendado).

Parece increíble que se haya tardado tanto tiempo en reconocer su importancia en la calidad del trabajo y bienestar laboral, muy relacionados, cuando como dice David Armstrong bajo el epígrafe "declarando lo obvio"[3].

> Toda organización es un espacio emocional. Porque es una invención humana, que sirve a propósitos humanos y que depende de seres humanos para funcionar. Y los seres humanos son seres emocionales, sujetos a sentir sorpresa, miedo, angustia, felicidad, alegría, tristeza...

Se está produciendo un cambio conceptual fundamental en el significado que se le ha dado a las emociones en las organizaciones: desde entenderlas como fuente de perturbación en su funcionamiento, a entender la experiencia emocional como una valiosa fuente de información acerca de las organizaciones, las relaciones entre quienes trabajan en ellas y la calidad de lo generado.

Influencia de las emociones en el trabajo

Los investigadores siguen acumulando evidencias acerca de la influencia de las emociones en nuestro comportamiento individual y del grupo al que pertenecemos o dirigimos. No importa lo racional que sea la tarea.

Como ejemplo, he aquí algunas de las formas de influir en el trabajo:

- El éxito de una misión de un avión de combate no sólo depende del trabajo del piloto. También del buen hacer y coordinación de un equipo de personas que llevan a cabo otras tareas, por ejemplo el mantenimiento del avión. Todos trabajan para que avión y piloto logren los objetivos encomendados. El líder de esos equipos juega un papel esencial en su rendimiento. Elisabeth Koman[4] descubrió que en equipos de la Marina Norteamericana había relación entre las competencias emocionales del líder y el número de averías de los aviones, el éxito de las misiones y el número de accidentes.

- Peter Jordan[5] comprobó cómo, en términos de rendimiento grupal, un equipo no entrenado formado por personas con alta competencia emocional era tan eficaz como otro entrenado pero cuyos miembros tuvieran una baja competencia emocional.

- Jane Yan[6] encontró evidencias de que las personas y grupos con habilidades en manejo emocional tenían más capacidad para manejar con provecho los inevitables conflictos laborales asociados a la tarea y entre personas.

Ciertos investigadores sugieren que a menudo la alta dirección no dispone de una buena información para tomar la mejor decisión. Y una de las principales razones resulta ser que los subordinados tienen miedo a decir la verdad. Incluso cuando el directivo no actúa de forma despiadada con su equipo, puede enviar inconscientemente señales sutiles que dejan claro que las malas noticias no son bien recibidas.

Otro modo de influencia es en las relaciones con clientes. En este caso la idea *las emociones venden*, ha sido usada inconscientemente a lo largo de la historia. Ahora su uso puede formar parte de una estrategia consciente: la Disney está construyendo su campaña de promoción de la nueva película de *La Guerra de las Galaxias* en torno a la "nostalgia"[7].

Las emociones generan actitudes hacia el trabajo y la empresa donde lo ejercemos: nuestra satisfacción laboral, nuestro compromiso para con el trabajo y lealtad hacia la empresa. También provocan comportamientos inmediatos concretos: si Ana decide ayudar al recién incorporado Julián a que comprenda y se acomode a su nuevo puesto preocupándose por él o si, en cambio, se limita a informarle fríamente de lo básico y lo abandona para que él mismo vaya descubriendo las necesidades y matices de la organización, la opción decidida por Ana, estará mediada emocionalmente. Lo mismo que si Roberto decide alargar, aunque no esté obligado contractualmente, el martes su jornada laboral para acabar un informe.

En roles de dirección, las últimas tendencias en gestión de personas, abogan por tener muy presente la dimensión emocional de la organización y a aprender a considerar y gestionar las emociones porque influyen directamente en los resultados empresariales.

Autocontrol emocional: de la represión a la gestión sosegada

Dirigiendo personas debes mostrarte emocionalmente sereno en todo momento. A pesar de todo lo dicho, todavía está extendida la idea de que la forma de lograr este requisito era reprimir sus emociones negativas y potenciar las positivas.

Mucho de lo escrito al respecto de las emociones en contextos de trabajo, maneja estos dos conceptos: "emociones positivas" y "negativas". A mi juicio, es conveniente que los lectores queden advertidos de dos peligros potenciales de esta conceptualización.

1.- Da a entender que existen unas emociones buenas y otras malas *per se*.

Esta idea lleva, casi de forma natural, a considerar que las malas, como todo lo malo, deben ser "eliminadas". La acción oportuna entonces, cuando alguien detecta en sí mismo ese tipo de emociones, es reprimirlas. Todo lo cual subraya la creencia de que para que, por ejemplo, un directivo cumpla con la necesidad de mostrarse emocionalmente sereno, debe reprimir sus emociones negativas.

En seguida veremos por qué reprimir las emociones (sean positivas o negativas) es contraproducente.

2.- Simplifica en exceso lo que, en realidad, es algo más complejo, y puede hacernos perder objetividad.

La dimensión emocional es compleja. El "amor", ¿es una emoción positiva? Pero un amor exagerado puede resultar irracional como ilustra la obra de teatro Otelo de W. Shakespeare. ¿Es la "ira" negativa? Pero en ciertas situaciones quizás sea el disparador necesario de un cambio para mejorar.

Por todo lo anterior, me parece más adecuado considerar la idea de *estados emocionales* que favorecen el trabajo y el bienestar y otros que lo dificultan. En este sentido podemos hablar de estados emocionales positivos y negativos no *per se* sino según sus consecuencias en mi trabajo y bienestar.

Pero más allá de los conceptos, reprimir los estados *emocionales negativos* resulta contraproducente. ¿Por qué?

- Primero, porque no por reprimirlos dejan de ser percibidos e influir en nuestro entorno.

- Segundo, porque no por reprimirlos dejan de influir sobre nuestro comportamiento más inteligente (del individuo y del grupo) y menoscabar el bienestar.

Se ha comprobado que las emociones se transmiten. De forma sutil, inconsciente, y muy rápida. Así, si mi estado emocional es negativo (por ejemplo, tengo una fuerte angustia generada por una preocupación concreta) por mucho que me esfuerce conscientemente en mostrar lo contrario (por ejemplo, entrando por la mañana en la oficina sonriendo y saludando con énfasis a todo el mundo), mi verdadero estado emocional subyacente bajo será lo que mis compañeros o equipo capte. De manera que ese comportamiento falsamente positivo, lejos de ocultarse, transmitirá incoherencia, confusión y sospecha.

También se ha comprobado que las emociones se contagian. Como los bostezos. De manera que aunque lo reprima no sólo transmitiré mi estado emocional sino que lo contagiaré, contribuyendo a generar un ambiente emocional que no facilite la mejor expresión de mi inteligencia práctica y la de mi equipo.

Pero hay algo más importante todavía.

La represión hará que mi estado *emocional negativo* influya con más firmeza en el ejercicio de mi inteligencia práctica. Por ejemplo, mermará mi objetividad para decidir si promocionar a este o aquel colaborador, o empobrecerá la calidad de mi análisis para suponer las causas de este problema y por tanto la solución decidida correrá el riesgo de ser mediocre, o reducirá mi capacidad de tratar profesionalmente a este cliente.

Si ejerzo tareas directivas, en lo que se refiere a mi equipo, la inexistencia de oportunidades para expresar sus estados emocionales compartidos puede permitir que los negativos sigan operando. Es decir, como antes, mermando su inteligencia práctica y bienestar, desmejorando los resultados de los que son potencialmente capaces.

La propuesta es, por tanto, cambiar *REPRIMIR* por hacer *CONSCIENTE* para *GESTIONAR* y usar las emociones como un recurso.

Emociones como información para dirigir (se)

La sugerencia es pasar de considerar las emociones como un estorbo para el trabajo a usarlas como información valiosa para dirigir equipos y dirigirme en el ejercicio de mi rol.

Del mismo modo que el dolor físico no es malo *per se* y lo usamos para ser advertidos de un posible problema que requiere nuestra atención. Así podemos utilizar las emociones.

Proporcionan información sobre:

- El propio estado emocional.
- Si se dirigen equipos, el estado emocional de cada miembro del equipo.
- El estado emocional del equipo en su conjunto y posibles orígenes. Por ejemplo, desde fuentes externas a la empresa como una noticia económica generadora de inquietud. O quizás una fuente interna como podría ser la llegada de una nueva persona al equipo o la salida de un miembro relevante del mismo. Ambas situaciones son potencialmente generadoras de perturbación emocional en el grupo.

¿Cómo escuchar esa información?

Uno de los recursos para hacerlo es evaluar, cada cierto tiempo, el propio estado emocional. Así ganaremos consciencia del mismo. Deberemos incorporar esta práctica a la jornada laboral normal, según nos convenga: por ejemplo, durante 5 minutos, sentado en tu mesa, antes de comenzar la jornada, a las 8:30. Y practicar. Sugiero planificar un programa de entrenamiento de 30 días para a continuación evaluar los resultados.

¿Cuál es el beneficio de esto?

Después de todo lo expuesto es fácil deducir los beneficios. En primer lugar, sólo con esa práctica regular, la autoevaluación

emocional conseguirá cumplir con más facilidad el requisito de mostrarnos emocionalmente sosegados.

Pero además, en nuestros equipos y en nosotros mismos, dirijamos o no, conseguiremos:

- Mantener a tono nuestra inteligencia práctica (al reducir la influencia de los estados negativos sobre ella).
- Contribuir a generar un entorno que facilite la cooperación y el trabajo en equipo.
- Reducir nuestro sobresfuerzo psíquico y el de nuestros colaboradores.

Así, atendiendo regularmente a las emociones en tanto que información, podremos manejar nuestro estado emocional y el de nuestro equipo, modulándolos en beneficio del trabajo asignado y del bienestar del grupo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Fisheri C.D. and Ashkanasy N.M. *The emerging role of emotions in work life: an introduction*. Journal of Organizational Behavior 2000, 21(2): 123-9.
2. Damasio A. *El error de Descartes*. Barcelona: Crítica (Drakontos), 2007.
3. Armstrong, D. *Organization in the mind*. London: Tavistock Clinic Series, 2005 (pág. 91)
4. Koman E.S. and Wolff S.B. *Emotional intelligence competencies in the team and team leader: A multi-level examination of the impact of emotional intelligence on team performance*. Journal of Management Development 2008, 27(1): 55-75.
5. Jordan P.J. *et al. Workgroup emotional intelligence: Scale development and relationship to team process effectiveness and goal focus*. Human Resource Management Review 2002, 12(2): 195-214.
6. Jiang J.Y., *et al. Emotion regulation as a boundary condition of the relationship between team conflict and performance: A multi-level examination*. Journal of Organizational Behavior 2013, 34(5): 714-34.
7. Recuperado de: http://www.inc.com/erik-sherman/oldie-but-goodie-marketing-tactic-emotion-sells.html

www.secal.es

sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

Foto: shutterstock

Un modelo al lado de los humanos

En España, la incidencia de sepsis grave y de shock séptico es de 104 y de 31 casos por 100.000 habitantes/año, respectivamente. Además el 10% de las asistencias en los servicios de urgencias están relacionadas con procesos infecciosos.

Los modelos murinos de infecciones (pulmonares, cardiacas, urinarias...) están contribuyendo de manera determinante a mejorar el conocimiento de la fisiopatología de la sepsis, y la relación del huésped con el agente patógeno. Estos "compañeros" están facilitando la disposición de paneles de biomarcadores específicos de sepsis, que combinados entre ellos, logren mejorar el manejo del enfermo con infección grave y su esperanza de vida.

SECAL sociedad española para las ciencias del animal de laboratorio

www.secal.es

El portal de la Sanidad Animal

Daniel Baizán Vicent

Una herramienta pionera en el ámbito de la sanidad animal en España, www.vetinnova.es, que contribuye a potenciar la visibilidad del conocimiento científico y tecnológico en este campo.

www.vetinnova.es

Para este número os voy a presentar un fantástico portal web al que llegué por casualidad, como me suele ocurrir, pero que desde el primer momento vi la necesidad de comentarlo por el alto potencial que puede llegar a tener en su uso.

En primer lugar hay que presentar el lugar, www.vetinnova.es, y nadie mejor que ellos para resumir el motivo de su creación: "La Plataforma Tecnológica Española de Sanidad Animal, Vet+i, nace en el 2008 con el firme compromiso de fomentar una investigación transferible en sanidad animal en España y facilitar y acelerar el desarrollo y la puesta en el mercado de tecnologías y productos innovadores de sanidad animal que satisfagan las necesidades del profesional veterinario y los sectores ganaderos. **Vetinnova** está orientado a facilitar y fomentar el *networking* y la colaboración entre todos los agentes públicos y privados del ámbito de la I+D+i en sanidad animal en nuestro país: las empresas de la industria de sanidad animal, los Organismos Públicos de Investigación, los grupos de investigación de Universidades, centros científicos y tecnológicos, otros centros privados de investigación, etc."

Una vez hemos centrado la atención sobre las posibilidades del portal, es el momento de navegar por él para enseñar las diferentes posibilidades que nos ofrece.

Para acceder a cada uno de sus apartados lo podemos hacer de dos formas: por la parte superior en la que encontramos una barra de distribución de temas que nos conducirá a cada apartado; o por el centro del portal en el que hay unos iconos que, igualmente, nos llevan a esas nuevas pantallas.

El portal se estructura en cinco grandes apartados que abarcan toda la cadena de innovación en sanidad animal. En estos cinco apartados se incluyen más de 1000 informaciones con gran nivel de detalle y de valor como son líneas de investigación y proyectos, ofertas científico-tecnológicas, patentes, líneas de interés de las empresas y requisitos reguladores.

En cada uno de estos cinco apartados vamos a encontrar una gran facilidad a la hora de buscar alguna información en ellos ya que disponen de buscadores específicos que utilizan una amplia variedad de criterios como área de conocimiento, especie animal, enfermedad, agente etiológico, organización, etc., que va a permitir localizar fácilmente la información deseada.

Libros y páginas web

Además de los cinco apartados principales encontramos otros tres adyacentes que son: Novedades, que permite al usuario estar informado sobre las últimas actualizaciones que se han producido en las distintas secciones que conforman el portal web; Consorcios, a través del cual, el interesado tiene acceso a una base de datos de propuestas de búsqueda de socios y ofertas de colaboración para participar en proyectos colaborativos publicadas tanto por centros de investigación y universidades como por empresas, incluyendo las PYMES; Aportaciones, que según expone el portal es un lugar en el que los usuarios pueden aportar la información relevante que consideren que deben ofrecer al resto de usuarios, por supuesto siempre se verificará la información antes de ser incluida en el apartado correspondiente.

Finalmente hay que recordar que Vetinnova es un portal web público, abierto a todos los agentes vinculados con la I+D+i en el ámbito de la sanidad animal de nuestro país. En este sentido, cualquier interesado puede acceder y participar activamente y beneficiarse de las múltiples ventajas y beneficios que ofrece esta herramienta de forma gratuita y sin necesidad de registrarse.

Asimismo, todo aquel interesado en adherirse a Vet+i solamente tiene que cumplimentar el formulario disponible en la página web de Vet+i www.vetmasi.es a través de la pestaña "Boletín de Adhesión". En este boletín encontraremos todo lo que difunde mensualmente Newsletter Vet+i y Novedades Vetinnova que incluyen todas las novedades que se van produciendo. Para darse de alta sólo hay que incluir su correo en Suscripción Newsletter.

Viajar "despierta".... No sólo la curiosidad

S. Maidana, I. Soria, L. Vagnoni, P. Zamorano y S. Romera
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria Castelar, Buenos Aires

Con la finalidad de realizar un estudio molecular, bioquímico y fisiológico sobre los efectos del transporte en el estrés, unos investigadores aprovecharon la circunstancia del traslado de 12 bovinos que iban a ser objeto de otro estudio diferente. Concretamente se trataba de evaluar la eficacia de diferentes vacunas frente a Fiebre Aftosa. Para ello, los animales se trasladaron desde una zona libre de dicha enfermedad (debajo del paralelo 42) hasta el INTA Castelar donde hay boxes de bioseguridad 3 (NBS3). El viaje se realizó por carretera y duró 28 horas. A su llegada a dichas instalaciones pasaron a cuarentena y se dividieron en dos grupos alojándolos en boxes de nivel de bioseguridad 2 (NBS2), para el seguimiento y adaptación previa a la entrada en los boxes NBS3. Se tomaron muestras de sangre con y sin anticoagulante antes del viaje y a distintas horas post-llegada. Se guardó el suero y se criopreservaron las células sanguíneas (para analizar parámetros de estrés y corroborar negatividad frente a Fiebre Aftosa por ausencia de anticuerpos y de excreción viral), también se tomaron muestra de sangre a los 11 y 21 días post-llegada, para serología.

A los 21 días de su llegada, todos los animales que compartieron una de las salas resultaron seropositivos frente a rinotraqueítis infecciosa bovina enfermedad respiratoria de bovinos, cuyo agente etiológico es el herpesvirus bovino 1 (*BoHV-1*), con acompañamiento de cuadro de conjuntivitis (ver Figura 1), indicando posible infección. A pesar de que los restantes 6 animales alojados en la otra sala compartieron el viaje, éstos no presentaron serología positiva ni aislamiento. Se aisló *BoHV-1* en células MDBK de 3 muestras (3 de 6 animales que compartían la sala) tras incubación de las muestras de secreciones oculares tomadas a los animales a distintos días post-llegada.

Una vez aislados, fueron amplificados y titulados en células MDBK. Los aislamientos fueron caracterizados virológica y genotípicamente. Para corroborar la identidad viral, se extrajo el DNA y se realizó una PCR diferencial entre *BoHV-1* y 5 (Claus M. P. *et al.*, 2005). Gracias a los estudios virológicos y moleculares se determinó que todos los aislamientos correspondían a *BoHV-1* y al subtipo *BoHV-1.2b*, pudiendo concluir que serían producto de un mismo brote (ver Figura 2).

Figura 1.- Cuadro de conjuntivitis mucopurulenta en dos de los animales en los que se aisló BoHV-1.

Además, el análisis serológico de las muestras previas al viaje confirmó que un animal era serológicamente positivo a *BoHV-1* aunque negativo respecto de excreción viral en ese momento, indicando una infección latente.

¿Y tú qué opinas?

¿Cuál es tu hipótesis?

¿Por qué no se detectó excreción de herpes en todos los animales si todos compartieron el viaje en el mismo camión?

¿Por qué a los 21 días post-llegada sólo seroconvirtieron en anticuerpos contra herpes los animales de una sala? ¿Qué dato previo indicaría esta situación?

¿Por qué se detectó excreción viral en las secreciones nasales y conjuntivales tras la llegada y no durante el transporte?

¿Por qué al clasificarse todos los aislamientos como subtipo BoHV-1.2b, se concluye que serían producto de un mismo brote?

¿Qué pruebas complementarias harías para determinar qué ocurrió?

SOLUCIÓN

El transporte, la vibración y movimiento del suelo, olores no familiares, ruidos, nuevo personal, nuevo alojamiento y

finalmente el manejo que sigue tras un período corto de adaptación, son críticos en la vida de un animal de producción y experimentación. La rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) es una enfermedad respiratoria de bovinos, cuyo agente etiológico es el herpesvirus bovino 1 (*BoHV-1*) que, al igual que otros miembros de la familia Alfaherpesviridae, establece infección latente. Este virus puede reactivarse bajo situación de estrés. La hipótesis es que la inmunosupresión y reactivación viral observada en un animal, y consecuente transmisión a animales libres del mismo, fue consecuencia del estrés excesivo provocado por periodos largos de transporte, ayunos y adaptación a un nuevo ambiente. Se infiere entonces que el animal con infección latente reactivó el virus, transmitiéndolo a los bovinos alojados en su misma sala.

La razón por la que no se detectó excreción del virus en todos los animales, a pesar de ir todos en el mismo camión, se explica porque el desarrollo de la enfermedad y excreción de *BoHV-1* fue posterior al viaje. Sólo hubo excreción y contagio en la sala donde se alojó el animal con infección latente.

Resultaron seropositivos sólo los animales de una sala, indicando infección por herpes, porque sólo en esta sala había un animal excretando. El dato de que un animal, previo al transporte, era positivo por anticuerpos a *BoHV-1* indica, sólo en ese animal, una previa infección y estado de latencia en el momento de inicio del transporte.

La inmunosupresión del animal con infección latente, y consecuente reactivación tras 28 h de viaje, explica el inició de la cadena de infección en los animales de la misma sala. Eso justifica que se detectara excreción viral nasal y conjuntival tras tres semanas de la llegada de los animales a las instalaciones.

Se deduce que el brote fue iniciado por el animal que pudo haber reactivado el virus por el estrés y fue el inicio de la cadena de infección, y no por contagios de los animales con distintos subtipos, ya que éstos eran, excepto uno, negativos tanto por determinación de anticuerpos como por excreción viral a *BoHV-1*.

Como pruebas complementarias para determinar lo ocurrido sería interesante la valoración de parámetros de estrés en el animal con infección latente. De este modo, la monitorización seriada de cortisol plasmático desde la salida de los animales y durante el transporte, por técnicas de ELISA, nos hubiese permitido precisar con más exactitud en que momento comenzó la inmunosupresión y relacionarla con la aparición del agente o agentes estresores.

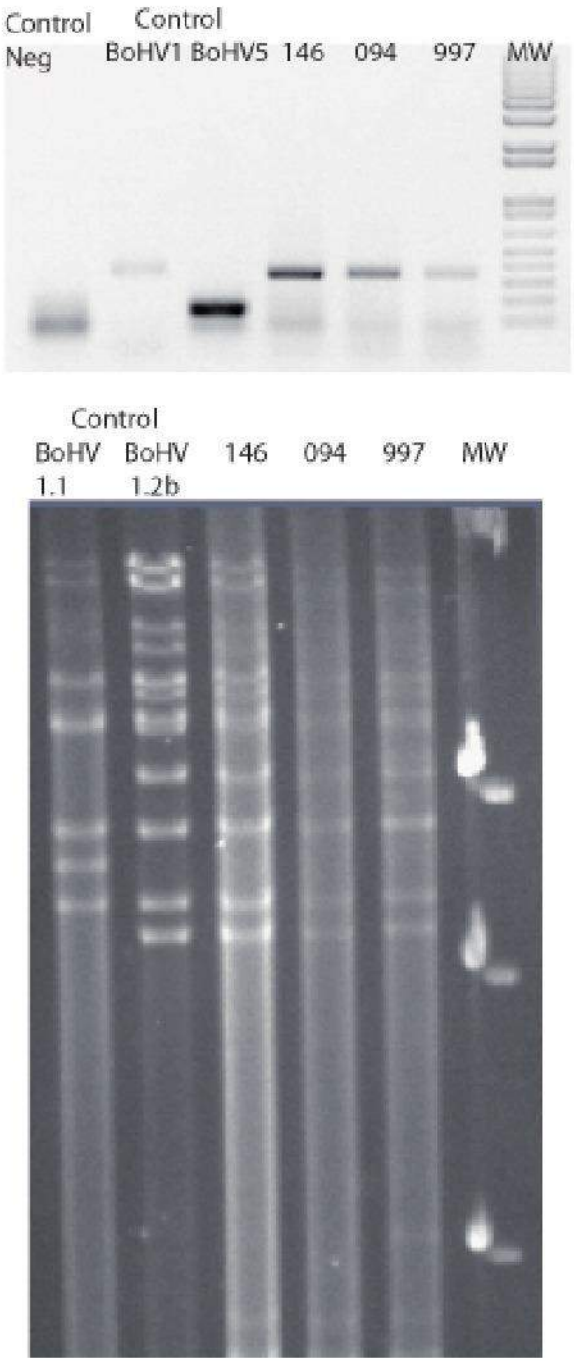


Figura 2.- PCR diferencial entre BoHV-1 y BoHV-5 (parte superior). Perfiles de restricción. Clasificación en subtipos de BoHV-1 (BoHV-1.1 y BoHV-1.2) (parte inferior). C1: Control negativo; C2: positivo BoHV-1 LA; C3: Control positivo BoHV-5 (N569); C4: aislamiento 146; C5: aislamiento 094; C6: aislamiento 997; C7: MW (Marcador de peso molecular 1Kb Ladder).

BIBLIOGRAFÍA

- Claus M.P. *et al. Rapid detection and differentiation of bovine herpesvirus 1 and 5 glycoprotein C gene in clinical specimens by multiplex-PCR.* J Virol Methods 2005, 128(1-2): 183-8.

ANÚNCIATE EN ANIMALES DE LABORATORIO
LA REVISTA DE LA SECAL

MÁS DE 400 SOCIOS RELACIONADOS CON EL SECTOR DE LOS ANIMALARIOS.

publicidad.revista@secal.es

sociedad española para las ciencias del animal de laboratorio

anibio

Software para la gestión de animalarios

1 gestión del animalario más sencilla

Pedidos de animales

Gestión de animales
- Cruces
- Líneas transgénicas
- Pedigrí

Gestión del animalario
- Gestión de usuarios
- Gestión de stock
- Equipamiento
- Gestión financiera

Comunicación con investigadores
- Notas
- Alarmas

Estadísticas e Informes
- Legislación Europea

2 que cumple con la nueva directiva

Tu solución para la nueva **Directiva UE 2010/63**

3 para cualquier tipo de animalario

desde centros individuales

a complejas redes institucionales

noraybio
NorayBG

Bilbao • Cambridge • Lyon • Turín

T+34 94 403 69 98 • anibio@noraybio.com • www.noraybio.com

Head office Castrop-Rauxel
Hermannstraße 2–8
44579 Castrop-Rauxel, Germany
phone +49 (0) 23 05 9 73 04-0
fax +49 (0) 23 05 9 73 04-44

Facility in Emmendingen
Fabrikstraße 2
79312 Emmendingen, Germany
phone +49 (0) 76 41 92 65-0
fax +49 (0) 76 41 47 97-2

Facility in Schönwalde
Hauptstraße 61b
16348 Wandlitz, Germany
phone +49 (0) 3 30 56 8 13-11
fax +49 (0) 3 30 56 8 13-12

BIOSCAPE
EBECO + EHRET FUSION

Full service lab animal technology

Representante en España:

Mari Carmen Viso

E-Mail maria-carmen.viso@bioscape.de
Teléfono + 34 6 55 76 38 28
Fax + 34 9 66 14 96 45

- Cages, racks for conventional animal husbandry
- Ventilated systems + IVC cages
- Individual cages
- Cage systems
- Transport + accessories
- Washing, cleaning + decontamination

info@bioscape.de

La percepción de las causas de los accidentes

Jesús Martínez Palacio
Técnico Superior en Prevención de Riesgos Laborales, CIEMAT

Decía el ilustre poeta...

En este mundo traidor
nada es verdad ni mentira:
todo es según el color
del cristal con que se mira.

Si esto es cierto en general, se puede comprobar que lo es especialmente en la percepción sobre las causas de los accidentes de trabajo que tienen los trabajadores que han sufrido un accidente respecto a la que tienen aquellos que no lo han sufrido personalmente.

En un informe publicado por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INSHT-ERGA) se analiza en este sentido la información procedente de la VII Encuesta Nacional de Condiciones de Trabajo.

Una de las preguntas se dirige a los trabajadores que han manifestado que en su trabajo existen riesgos de accidente, pero que no han sufrido ellos mismos un accidente. Se les pide que de una lista de posibles causas de los riesgos detectados, elijan las tres que les parecen más importantes. Y se efectúa la misma pregunta a los trabajadores que han sufrido un accidente de trabajo en los dos últimos años. Los primeros opinan sobre lo que podría suceder; los segundos, sobre lo que ha sucedido. Como era de esperar, se trata de cristales bien distintos con qué mirar (ver Gráfico 1).

El INSHT nos indica que para quienes **no han sufrido un accidente** las causas autoculpabilizadoras (distracciones, descuidos, etc.) ocupan el primer lugar (las votan el 46.3% de los entrevistados). Aunque sigue siendo la primera causa entre quienes han sufrido un accidente, el porcentaje de "votantes" se reduce a la mitad (23%).

Los trabajadores que **sí han sufrido un accidente** creen que contribuyen más a la producción de accidentes las posturas forzadas y el levantar o mover cargas pesadas, lo que se ajusta muy bien al hecho de que, según el último informe de siniestralidad elaborado por el INSHT, casi el 40% de los accidentes con baja se deben a sobreesfuerzos.

El informe de la VII Encuesta Nacional de Condiciones de Trabajo (57 páginas, Julio 2012) está disponible en:
http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FICHAS%20DE%20PUBLICACIONES/EN%20CATALOGO/OBSERVATORIO/Informe%20(VII%20ENCT).pdf

Quien desee una información más elaborada pueden obtenerla con los distintos medios que el INSHT tiene a vuestra disposición en:
http://encuestasnacionales.oect.es/enge/EngeAnalisis.jsp

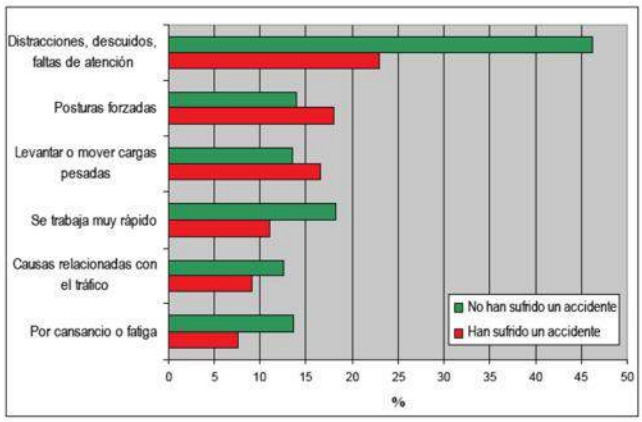
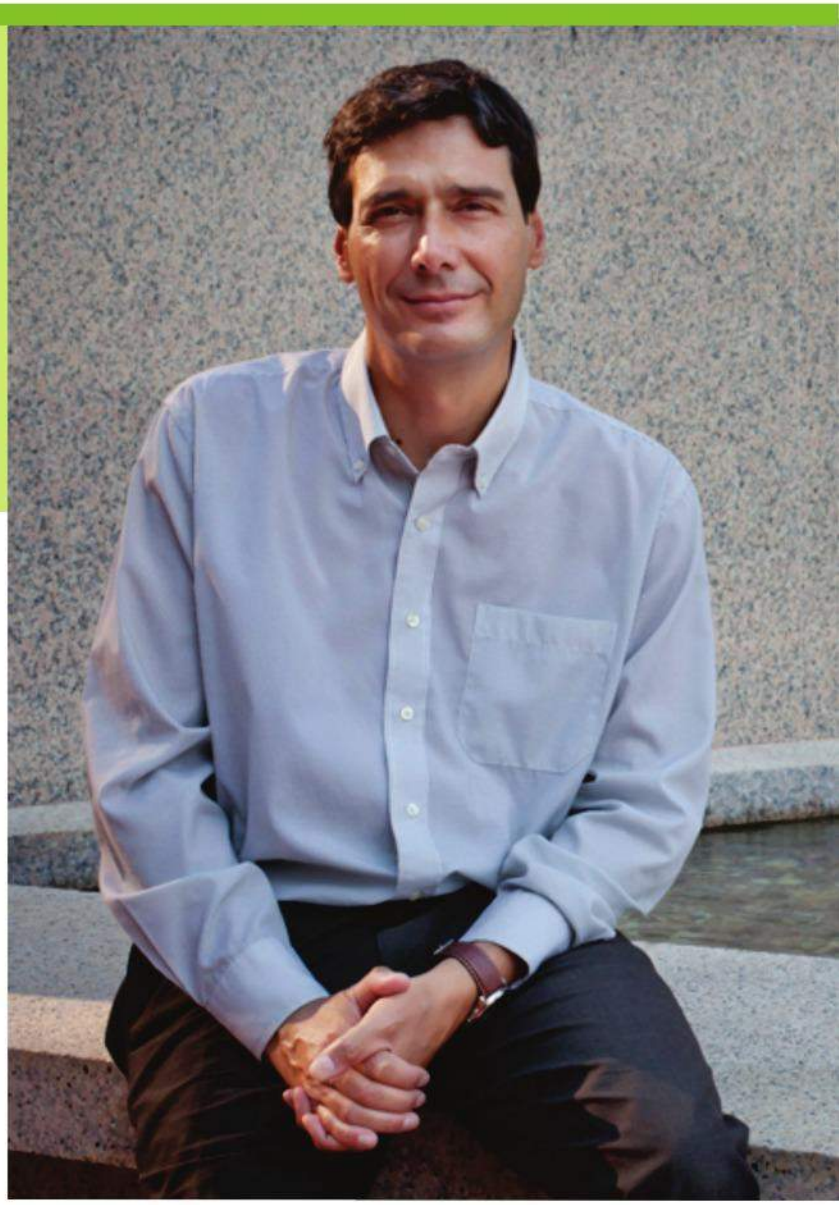


Gráfico 1.- Tomado de ERGA *on-line*, INSHT.

Manuel Serrano

Director del Programa de Oncología Molecular del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Obtuvo su doctorado en 1991 por sus investigaciones en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. De 1992 a 1996 trabajó como Investigador Postdoctoral en el laboratorio del Dr. Beach en el Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York, EE.UU. En 1997, regresó a España y creó su propio grupo de investigación en el Centro Nacional de Biotecnología. Se trasladó al CNIO en 2003 para dirigir el Grupo de Supresión Tumoral.



***Antes de ir a las células.* ¿Conoce la SECAL?**

Por supuesto, es una sociedad muy activa enfocada en la experimentación animal y todos los aspectos relacionados con ella: técnicos, formativos, éticos y científicos.

***Y ya dentro de ellas.* De fibroblastos de la endodermis a neurona, ¿cómo explicaría brevemente el concepto de reprogramación celular y su importancia en el contexto de un organismo completo?**

Todo esto se puede resumir con la idea de plasticidad celular. Hasta no hace mucho se pensaba que la identidad de las células era casi inmutable; sin embargo, desde hace unos 8 años, ha habido toda una revolución científica al descubrirse que las células tienen un enorme grado de plasticidad una vez que se identifican los reguladores clave para inducir esos cambios de identidad celular.

Podríamos entonces hablar de una herramienta biotecnológica... ¿cuál sería su aplicación biotecnológica, en el campo por ejemplo de la medicina regenerativa?

Hoy en día la medicina regenerativa es un campo incipiente. La base de este tipo de medicina es curar con células (en lugar de curar con cirugía o con fármacos). El problema reside en que hay que disponer de células sanas del mismo paciente antes de plantearnos curar. La reprogramación es una herramienta fabulosa que permite obtener células sanas de un paciente (p. ej. de la endodermis que se mencionaba antes) y convertirlas, por ejemplo, en neuronas sanas para tratar una enfermedad neurodegenerativa. Esto hace poco era ciencia ficción y hoy ya se están haciendo los primeros ensayos clínicos. Es algo que aún tardará años, pero sin duda llegará a ser una realidad de la que nos beneficiaremos todos.

***Y acudiendo ya en el animalario.* ¿Qué papel ha jugado el modelo animal en sus hallazgos científicos?**

Los ratones de laboratorio son los primeros en recibir las terapias más sofisticadas e innovadoras. Los avances en medicina regenerativa y reprogramación serían completamente impensables de no haber sido por el trabajo que se ha hecho en ratones. Han jugado un papel fundamental.

Podemos decir que en parte gracias al modelo animal, hemos avanzado en el conocimiento de los mecanismos moleculares que acontecen en determinadas patologías; por lo tanto ¿no es lo mismo tener un cáncer ahora, que 10 años atrás?

De eso no tengo ninguna duda. El progreso en la investigación y, por lo tanto, su aplicación posterior a la medicina, durante los últimos 10 años se ha basado fundamentalmente en los hallazgos hechos inicialmente en ratones.

Células madre embrionarias *in vivo* vs. *in vitro*. Estamos hablando mucho de unas "nuevas células madre", las iPS (*induced Pluripotent Stem Cells*) ¿qué ventajas y desventajas presentan frente a las células madre embrionarias?

Las iPS representan un caso de plasticidad extrema en el que una célula del cuerpo se convierte en una célula madre embrionaria, con todo su potencial para diferenciarse en cualquier tipo celular. Es un fantástico descubrimiento que todavía me causa asombro. Las iPS son funcionalmente equivalentes a las auténticas células madre embrionarias, con dos ventajas importantísimas: las iPS se obtienen de una manera bastante sencilla a partir de cualquier célula del cuerpo (p. ej. la piel); y no implican ni óvulos humanos ni embriones humanos, por lo que no generan ningún reparo ético.

En este sentido, últimamente se ha publicado un trabajo (Obokata *et al.*, 2014)[1] en el que acidificando el medio de cultivo y estimulando de forma sub-letal a células somáticas, se podrían conseguir iPS (las llamadas *STAP cells*). ¿Qué opinión le merece este trabajo y que repercusión a su juicio tendría en la terapia?

Lamentablemente este trabajo está generando muchas dudas. Por una parte, no parece fácil de reproducir y de hecho nadie lo ha conseguido hasta ahora, y por otra, los autores han sido poco rigurosos en la forma en la que han presentado los datos. Es muy posible que este trabajo se retracte. Aun así, debo decir que la idea de que el daño celular pueda de alguna manera iniciar o favorecer la reprogramación es muy atractiva. En otras palabras, puede que haya algo de verdad en todo esto. El tiempo irá poniendo todo en su sitio.

≪Los avances en medicina regenerativa y reprogramación serían completamente impensables de no haber sido por el trabajo que se ha hecho en ratones. Han jugado un papel fundamental≫

Estamos consiguiendo muchos logros, algunos de ellos con importante impacto social en los años venideros, pero como si de directores de ciencia ficción se tratase, ¿tendremos un día un ratón que no envejezca ni tenga cáncer?

Bueno, ratones que (casi) no tienen cáncer es una de las cosas que mi grupo hizo en el pasado. Introduciendo copias génicas extra de genes protectores del cáncer, p53 y p16, hemos generado unos ratones, a los que llamamos super-ratones, que prácticamente no tienen cáncer y viven algo más que los normales. Con el envejecimiento se ha conseguido retrasarlo un poco, pero sigue siendo un desafío para el futuro el conseguir grandes aumentos en la longevidad. Yo estoy convencido de que se conseguirá.

***Ya para terminar.* ¿Son las células madre embrionarias el único y más importante pilar sobre el que fundamentar la cura en un futuro de enfermedades como el Alzheimer, el Parkinson o la diabetes?**

El único no, pues hay una investigación muy rica y variada en estos temas, y nunca se sabe qué es lo que va a ser más eficiente. Muchas veces es una combinación de aproximaciones. Pero sin duda, las células madre embrionarias pueden desempeñar un papel fundamental en el tratamiento futuro de estas enfermedades.

[1] Obokata H., *et al. Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency*. Nature 2014, 505: 641-7.

Powering your research development

vivotecnia
management & services

Profesionales al servicio de la investigación

Servicios integrales para Animalarios

...

Externalización de servicios de Animalarios

...

Formación de personal

...

Diseño de Instalaciones

...

Alquiler y gestión de Instalaciones

...

Consultoría y Asesoramiento

...

www.vivotecnia-ms.com

sociedad española
para las ciencias
del animal de laboratorio

PRINCIPIOS ÉTICOS EN INVESTIGACIÓN Y DOCENCIA CON MODELOS ANIMALES

1

SE DEBE EVITAR EL USO DE ANIMALES CUANDO EXISTA UN MÉTODO ALTERNATIVO QUE PROPORCIONE RESULTADOS SATISFACTORIOS.

2

EL BENEFICIO FINAL DEL USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN DEBE ESTAR CLARAMENTE DEFINIDO EN CADA PROTOCOLO. LA EVALUACIÓN DE LA NECESIDAD DE SU USO DEBE REALIZARSE POR UN COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.

3

LOS ENSAYOS QUE INCLUYEN ANIMALES COMO MODELO EXPERIMENTAL DEBEN REALIZARSE EN ESTABLECIMIENTOS USUARIOS REGISTRADOS. LOS ANIMALES DEBEN PROCEDER DE ESTABLECIMIENTOS DE CRÍA REGISTRADOS, CON LA ÚNICAS EXCEPCIONES QUE SE CONTEMPLAN EN LA NORMATIVA VIGENTE.

4

LAS PERSONAS QUE TOMEN PARTE EN LOS PROCEDIMIENTOS CON ANIMALES DEBEN TENER FORMACIÓN ESPECÍFICA EN CIENCIAS DEL ANIMAL DE LABORATORIO, ADECUADA AL TIPO DE INTERVENCIÓN QUE REALICEN. LA SALUD Y BIENESTAR DE LOS ANIMALES DEBE SER PERMANENTEMENTE CONTROLADA POR PERSONAL LEGALMENTE CAPACITADO.

5

SE DEBE UTILIZAR EL MÍNIMO NÚMERO DE ANIMALES QUE GARANTICE RESULTADOS EXPERIMENTALES ESTADÍSTICAMENTE FIABLES.

6

LOS ANIMALES DEBEN ESTAR ESTABULADOS EN JAULAS Y RECINTOS QUE REÚNAN CONDICIONES AMBIENTALES APROPIADAS PARA CADA ESPECIE, EN LOS QUE, ADEMÁS, PUEDAN DESARROLLAR COMPORTAMIENTOS PROPIOS DE SU ESPECIE.

7

LOS ENSAYOS DEBEN REALIZARSE CON UN GRADO DE REFINAMIENTO QUE EVITE DOLOR, SUFRIMIENTO O ANGUSTIA INNECESARIOS DE LOS ANIMALES. SE DEBEN ESTABLECER CRITERIOS DE PUNTO FINAL, Y PAUTAS DE ANESTESIA Y ANALGESIA ADECUADAS EN FUNCIÓN DE LA SEVERIDAD DE CADA PROCEDIMIENTO.

8

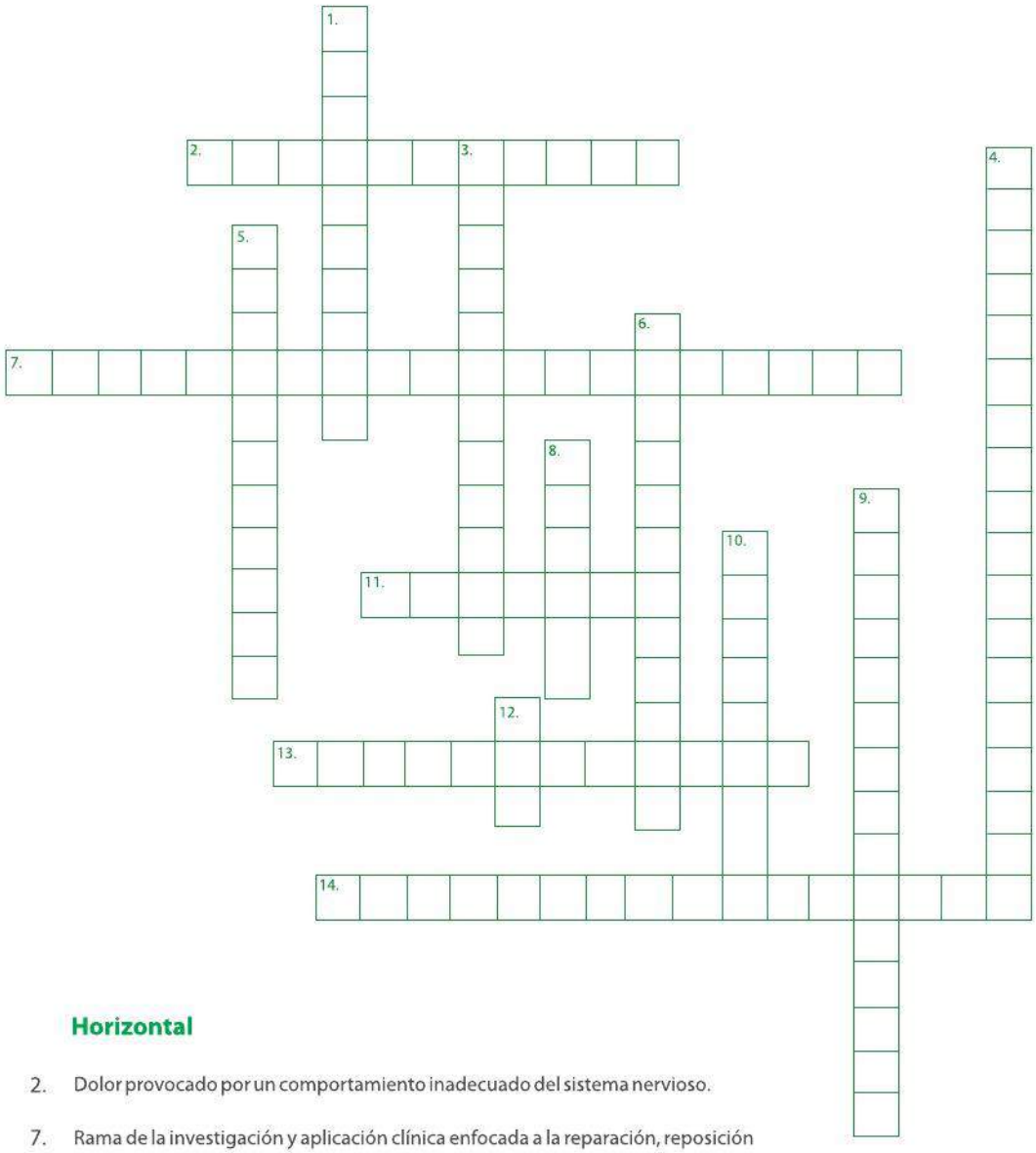
PARA LA EUTANASIA, CUANDO SEA NECESARIA, SE DEBE APLICAR UN MÉTODO ÉTICA Y CIENTÍFICAMENTE APROBADO QUE REDUZCA AL MÍNIMO EL DOLOR Y EL ESTRÉS EN LOS ANIMALES.

9

NORMATIVA BÁSICA ACTUAL:
REAL DECRETO 53/2013, SOBRE LAS NORMAS BÁSICAS APLICABLES PARA LA PROTECCIÓN DE LOS ANIMALES UTILIZADOS EN EXPERIMENTACIÓN Y OTROS FINES CIENTÍFICOS.

www.secal.es

Crusecal



Horizontal

2. Dolor provocado por un comportamiento inadecuado del sistema nervioso.

7. Rama de la investigación y aplicación clínica enfocada a la reparación, reposición o regeneración de células, tejidos u órganos.

11. Variedad de analgésico en el manejo del dolor moderado a severo.

13. Método de estudio basado en la integración estructurada y sistemática de la información obtenida en diferentes estudios clínicos, sobre un problema de salud determinado.

14. Zona de temperatura ambiental en la que el animal requiere un gasto energético mínimo.

Vertical

1. Administración dentro de las meninges, en el liquido cefalorraquídeo mediante punción lumbar.

3. formación de nuevos vasos sanguíneos.

4. Capacidad de algunas células de generar todos los tejidos que se producen en el desarrollo embrionario.

5. Tipo de célula madre que posee la capacidad de dar origen a cualquier tipo celular del organismo.

6. Conjunto de procesos que permiten la transferencia de un gen.

8. Conjunto de experimentos y de fenómenos observados que se efectúan directamente sobre el organismo vivo.

9. Rico en células madre hematopoyéticas o sanguíneas, útiles en tratamientos de medicina regenerativa.

10. Enfermedad neurodegenerativa que se manifiesta como deterioro cognitivo y trastornos conductules.

12. Centro Nacional de Biotecnología.

The Weight is Over.

No longer do you need to spend your time conditioning research models. There is now an immediate solution - Preconditioning Services from Charles River. Whether preparation for your study requires feeding special diets, aging of animals, phenotypic evaluations, or surgical manipulations, Charles River can provide you with animals preconditioned to your parameters and ready for use when they enter your facility.
For more information, please contact us at services@eu.crl.com

charles river
accelerating drug development. exactly.

services@eu.crl.com
www.criver.com

harlan™

Referencias disponibles bajo demanda.

Rendimiento probado de líneas celulares.

Tal como demuestran publicaciones de las más reconocidas instituciones investigadoras de todo el mundo, los modelos oncológicos de Harlan Laboratories ofrecen especificaciones de alta calidad, dietas y servicios de asistencia que pueden necesitar en su investigación contra el cáncer.

Para más información, visite nuestra Web www.harlan.com/oncology.

Modelos

Dietas

Servicios

www.harlan.com

©2010 Harlan Laboratories, Inc.
Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better, and the Harlan logo are trademarks of Harlan Laboratories, Inc.