

monografía

ciclo de
conferencias y debates en

ciencias

FUNDACIÓN RAMÓN ARECES
NATURE PUBLISHING GROUP

Medicina regenerativa REGENERATIVE MEDICINE

Promesa de futuro
PROMISE OF FUTURE

FUNDACIÓN
RAMÓN ARECES

nature publishing group 
iberoamérica

monografía

ciclo de
conferencias y debates en

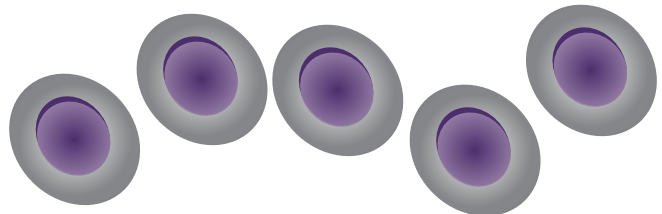
ciencias

FUNDACIÓN RAMÓN ARECES
NATURE PUBLISHING GROUP

MEDICINA REGENERATIVA
REGENERATIVE MEDICINE

Promesa de futuro
Promise of future

Madrid, 5 de febrero de 2015
FUNDACIÓN RAMÓN ARECES
C/ Vitruvio, 5 • 28006 Madrid



FUNDACIÓN
RAMÓN ARECES

nature publishing group 
iberoamérica

© 2015 Nature Publishing Group Iberoamérica, S. L.
C/ Capitán Haya 1, edificio Eurocentro, 9º
28010 Madrid (España)
Tel.: (+34) 91 447 46 43
www.npgiberoamerica.com

Depósito legal: M-9900-2015
Impreso en España – Printed in Spain



ÍNDICE



Medicina regenerativa

PRESENTACIÓN	
Federico Mayor Zaragoza	7
José María Medina	8
Javier Cazaña Aguilar	9
INTRODUCCIÓN	
Juan Carlos López	13
CONFERENCIAS	
APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS	
Ángel Raya	17
REGENERACIÓN PLURIPOTENTE INDEPENDIENTE DE ÓRGANOS ESTABLES MEDIANTE INDUCCIÓN VASCULAR	
Shahin Rafii	23
USO DE LA REPROGRAMACIÓN DIRECTA PARA LA REPARACIÓN NEURONAL	
Sergio Gascón	29
CÉLULAS MADRE ESQUELÉTICAS Y SUS DOBLES “MESENQUIMALES”	
Paolo Bianco	33
DEBATE	
Juan Carlos López, Ángel Raya, Shahin Rafii, Sergio Gascón y Paolo Bianco	39



Regenerative medicine

PRESENTATION	
Federico Mayor Zaragoza	45
José María Medina	46
Javier Cazaña Aguilar	47
INTRODUCTION	
Juan Carlos López	51
LECTURES	
BIOMEDICAL APPLICATIONS OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS	
Ángel Raya	55
PLURIPOTENT-INDEPENDENT REGENERATION OF STABLE ORGANS ENABLED BY VASCULAR NICHE INDUCTION	
Shahin Rafii	61
USE OF DIRECT REPROGRAMMING FOR NEURONAL REPAIR	
Sergio Gascón	67
SKELETAL STEM CELLS AND THEIR “MESENCHYMAL” DOPPELGANGER	
Paolo Bianco	71
DISCUSSION	
Juan Carlos López, Ángel Raya, Shahin Rafii, Sergio Gascón and Paolo Bianco	77

presentación



Federico Mayor Zaragoza

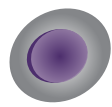
Presidente del Consejo Científico
de la Fundación Ramón Areces

José María Medina

Miembro del Consejo Científico de la
Fundación Ramón Areces

Javier Cazaña Aguilar

Director General de
Nature Publishing Group Iberoamérica



Presentación

Celebramos la séptima colaboración entre la Fundación Ramón Areces y el grupo Nature, una interesante iniciativa, que forma ahora ya parte del programa habitual de la Fundación.

No cabe duda de que el tema de este año, la medicina regenerativa, es de los más atractivos que se han tratado hasta ahora por dos razones: en primer lugar, por lo que tiene de futuro, pero también por lo que puede representar desde un punto de vista no sólo científico, sino clínico.

Siempre recuerdo que la finalidad de D. Ramón Areces, cuando creó esta Fundación que lleva su nombre, fue la de abordar la ciencia precisamente para evitar o paliar el sufrimiento humano.

Y la temática escogida en esta ocasión tiene esta doble vertiente: un gran interés científico, pero, al mismo tiempo, el hecho de que estos conocimientos puede conducir a una clara aplicación clínica, destinada precisamente a evitar o mitigar el sufrimiento humano.

Las células troncales o pluripotentes son uno de los campos más fascinantes en estos momentos, no sólo porque ofrecen la posibilidad de regeneración tisular, sino porque tienen potencial para utilizarse en trastornos genéticos mediados por la regulación epigenética. En todas estas áreas hoy tenemos la posibilidad, a través de células desarrolladas con estos sistemas, como cardiomiocitos, hepatocitos u osteocitos, de fabricar lo que se podrían denominar “miniórganos”. Todo esto forma parte de un gran panorama actual que hoy nos mostrarán excelentes científicos que tienen muy presente la posibilidad de aplicación clínica de estos progresos. |

Federico Mayor Zaragoza

Presidente del Consejo Científico de la Fundación Ramón Areces



Como extensión de las palabras del profesor Mayor Zaragoza, les doy la bienvenida a esta Jornada en nombre de la Fundación Ramón Areces, cuyo Consejo Científico, representado aquí por los profesores Mayor Zaragoza, Rodríguez Villanueva y por mí mismo, ha tomado un gran interés en su organización.

Este acto se encuadra en una larga y fructífera colaboración entre el grupo Nature y nuestra institución, durante la cual hemos organizado reuniones no sólo muy interesantes en el momento en el contexto que se realizaron, sino que han tenido una repercusión extraordinaria.

Por poner un ejemplo, en 2009 se abordó el tema de los “genomas personales”. En aquel momento se percibían como un gran reto y se pensaba que muchos de los asistentes a aquel evento no llegarían a verlos realizados en la práctica diaria. Sin embargo, hoy, sólo seis años después, la secuenciación masiva permite el conocimiento de los genomas personales y, por lo tanto, aquello que parecía una utopía es ya una clara realidad.

A lo largo de estos años hemos tratado también la nanotecnología, la medicina personalizada, las enfermedades autoinmunes y la diabetes tipo 2, sobre la que se centró la conferencia del año pasado. Todos ellos temas de actualidad y con un gran interés desde el punto de vista tanto científico como clínico.

En esta ocasión abordamos la medicina regenerativa, que es una gran oportunidad para la ciencia puesto que persigue algo que se podría incluso calificar de utopía: la posibilidad de manejar nuestras células y construir un tejido o, por lo menos, suplir aquellos huecos que la degeneración ha dejado. Pero es también una gran esperanza; posiblemente entre esas esperanzas que quizá ahora vemos un poco lejanas, pero que, como en el caso de los genomas personalizados, posiblemente dentro de un par de años comiencen a ser una realidad.

Asimismo, quiero agradecer a todos su asistencia a este acto porque con ello colaboran con nosotros al desarrollo de la idea que nuestro fundador perseguía, es decir, la difusión de la ciencia española en el extranjero y de la ciencia extranjera en España, para que exista un foro en el que contacto entre unos y otros, establezca las oportunas sinergias que tanto deseamos.

Finalmente, quería agradecer a los ponentes, especialmente los que vienen desde el extranjero, por participar en lo que estoy seguro será una fructífera reunión. ■

José María Medina

Miembro del Consejo Científico de la Fundación Ramón Areces



Bienvenidos a esta nueva conferencia-debate celebrada en colaboración entre la Fundación Ramón Areces y Nature Publishing Group Iberoamérica, y dedicada en esta ocasión a la medicina regenerativa.

Este año celebramos la séptima edición de un formato que ha permitido dar difusión a los avances que se han producido en diversas áreas de la ciencia, a través de la participación de investigadores de los centros más prestigiosos a nivel mundial.

Quiero agradecer a todos los componentes de la Fundación Ramón Areces que hacen posible y participan en este evento, y especialmente al Comité Científico, representado en esta mesa por los profesores Federico Mayor Zaragoza y José María Medina, al Director General de la Fundación, el Sr. Raimundo Pérez-Hernández y Torra, así como al Sr. Manuel Azcona, director de comunicación.

No quiero dejar de destacar el papel de la Fundación Ramón Areces en la promoción de la ciencia y en la difusión de sus avances, que permiten actividades como ésta.

Este año abordamos un tema con una elevada repercusión mediática, algo que hace unos años para la comunidad no científica era percibido como lejano, casi propio de la ciencia ficción, y que ahora recibe información continua de los avances a través de los diversos medios generales.

Un claro ejemplo del aumento de la investigación en el área lo podemos ver haciendo unas búsquedas de los últimos 15 años en PubMed, buscador biomédico de referencia a nivel mundial. El número total de citas incluidas en el buscador entre 2010 y 2014 es un 68% mayor a las incluidas entre 2000 y 2004. Además, si para esos períodos acotamos la búsqueda para los términos “Regenerative Medicine” y “Tissue Engineering”, el aumento de citas es de un 400%.

Para conocer de primera mano todos estos avances, este año contamos con la participación de cuatro profesionales que son referencia en la investigación que se realiza en el área. Agradezco a los Dres. Ángel Raya, Shahin Rafii, Sergio Gascón y Paolo Bianco que hayan aceptado nuestra invitación a participar en este evento. Al igual que en años anteriores, la moderación del evento correrá a cargo del Dr. Juan Carlos López, ex editor jefe de *Nature Medicine*.

Espero que disfruten de esta jornada. |

Javier Cazaña Aguilar

Director General de Nature Publishing Group Iberoamérica

Introducción



Juan Carlos López

Ex Editor de *Nature Medicine*

Licenciado en Investigación biomédica por la Universidad Nacional Autónoma de México, obtuvo el doctorado en neurobiología y conducta en Columbia University (Nueva York), donde se dedicó al estudio de los mecanismos celulares y moleculares de formas simples de memoria, en el laboratorio de Eric Kandel. Antes de introducirse en el mundo editorial, Juan Carlos trabajó en el Instituto Cajal (CSIC, Madrid), estudiando aspectos funcionales de la neurotransmisión inhibitoria. En noviembre de 1999 fue galardonado con el premio europeo de divulgación científica "Estudi General" por su libro *El Taller de la Memoria*. Ha sido editor jefe de las revistas *Nature Medicine* y *Nature Reviews Neuroscience*.



Introducción

Muchas gracias por esta nueva invitación; es un placer venir y compartir mi tiempo con la Fundación Ramón Areces y reunirme con científicos tan eminentes como los que hoy nos acompañan.

Aunque personalmente yo no soy tan optimista con respecto a la medicina regenerativa, en esta ocasión las conferencias sobre lo que se puede hacer o no actualmente en este campo son las más apasionantes de las presentadas a lo largo de todos estos años, y espero que susciten un intenso debate.

Con ese fin, los cuatro ponentes se complementan a la hora de preguntarse de qué se habla exactamente cuando se aborda el asunto de las células madre. Hay muchos tipos de estas células: mesenquimales, embri-

narias, inducidas y otras formas mágicas de convertir una célula en otra. Todas desempeñan un importante papel en el campo científico y no queríamos olvidarnos de ninguna, por lo que hemos intentado que el programa incluya diferentes tipos de células madre en distintos órganos, porque la medicina regenerativa, aunque se ha desarrollado mucho en el sistema hematopoyético, por ejemplo, también se está estudiando en otros campos que suponen un mayor desafío, como el sistema nervioso, el óseo y el vascular.

Así, nuestros ponentes nos van a hablar de diferentes sistemas y tipos de células madre, y espero que, al final de la tarde, ustedes tengan una mejor comprensión de cuál es el panorama actual y de lo que podemos esperar a corto, medio y largo plazo. **|**

conferencias

● APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS

Ángel Raya

Investigador principal del grupo 'Control de Potencia de las Células Madre' del Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC) y director del Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona

● REGENERACIÓN PLURIPOTENTE INDEPENDIENTE DE ÓRGANOS ESTABLES MEDIANTE INDUCCIÓN VASCULAR

Shahin Rafii

Investigador del Instituto Howard Hughes de Medicina, miembro de la Sociedad Americana de Investigación Clínica y catedrático de Medicina Génica en el Weill Cornell Medical College de Nueva York

● USO DE LA REPROGRAMACIÓN DIRECTA PARA LA REPARACIÓN NEURONAL

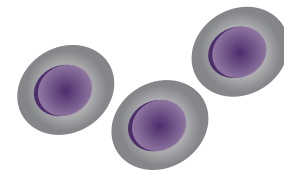
Sergio Gascón

Investigador del Instituto Helmholtz de Investigación de Células Madre, Munich, Alemania

● CÉLULAS MADRE ESQUELÉTICAS Y SUS DOBLES "MESENQUIMALES"

Paolo Bianco

Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Patología en el departamento de Medicina Experimental, Universidad La Sapienza de Roma, Italia



Aplicaciones biomédicas de las células madre pluripotentes inducidas

Ángel Raya

Investigador principal del grupo ‘Control de Potencia de las Células Madre’ del Instituto de Bioingeniería de Cataluña (IBEC) y director del Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona.

En 2006, un descubrimiento en ratones sacudía a la comunidad científica. El laboratorio del japonés Shinya Yamanaka demostró que de un animal vivo –en este caso, un ratón– se podían extraer células somáticas, en un primer término fibroblastos, y reprogramarlas para convertirlas en algo que se comportaba como una célula madre embrionaria, que se podía mantener en el laboratorio y que era capaz de propagarse indefinidamente. Además, tenía la posibilidad de diferenciarse en células de cualquier tipo y, como pronto se demostró, de una célula de este tipo se podían generar ratones vivos. Es decir, se trataba de células madre pluripotentes.

Este crucial evento científico que tuvo lugar en 2006 en el ratón en seguida levantó expectativas sobre sus implicaciones clínicas. En concreto, la esperanza se centró en definir aplicaciones biomédicas de las células madre pluripotentes inducidas (iPS), como se las denominó.

Como recuerda el Prof. Ángel Raya, pronto se vio que esta idea podía trasladarse a las células humanas y, entre finales de 2007 y principios de 2008, tres grupos, incluido el del propio Yamanaka, mostraron que, usando una técnica muy similar a la utilizada en ratón, las células somáticas humanas también se podían reprogramar y parecerse mucho a las células madre embrionarias humanas. “En nuestro centro hemos invertido mucho esfuerzo en esto, fuimos el primer grupo en Europa que generó estas células inducidas humanas; en aquella época utilizamos retrovirus para introducir los factores



Ángel Raya

de crecimiento en las células y que se reprogramaran, la misma técnica que usó Yamanaka”, recordó Raya.

En la actualidad hay distintas formas de introducir dichos factores y en un período de tiempo que en el caso humano oscila entre cuatro y seis semanas, la morfología, el perfil transcripcional y epigenético, y, en definitiva, todo lo que define la identidad de la célula que está reprogramándose, en este caso fibroblastos dérmicos, pasa a ser algo que tiene el aspecto y el comportamiento de las células madre embrionarias humanas.

Es una técnica muy robusta que se ha reproducido en muchos laboratorios, se ha utilizado en muchas especies, con diferentes técnicas para reprogramar distintos



“La terapia de reemplazo celular es especialmente relevante en las enfermedades degenerativas.”

tipos de células somáticas, y que actualmente utilizan cientos de laboratorios. Como aclaró Raya, las aplicaciones básicas que los diferentes investigadores están estudiando son tres: entender la reprogramación celular, desarrollar terapias de reemplazo celular, tanto para tratar enfermedades degenerativas como monogénicas, y, por último, modelar la enfermedad humana y poder así analizar sus mecanismos patogénicos, los genes que causan las distintas patologías, el inicio y la progresión de las enfermedades y el cribado de eficacia y toxicidad de fármacos.

Entender la reprogramación y sus aplicaciones

Con respecto al primer campo, el investigador enfatizó que en la actualidad existe mucha investigación en el uso de esta tecnología para comprender cómo tiene lugar la reprogramación, cómo adquieren pluripotencia estas células, cómo adquieren identidad y cómo escapan a la senescencia. “Todo esto pertenece al campo de la ciencia básica y la realidad es que estamos obteniendo una información muy valiosa de estos mecanismos y de cómo tienen lugar”, apuntó el Prof. Raya.

En cuanto a las aplicaciones médicas, la que en un principio capturó más la atención de los científicos fue la posibilidad de usar tecnología para reprogramar células de pacientes y diferenciarlas de forma que se pudiera desarrollar la célula que le falta al enfermo. Es lo que se llama terapia de reemplazo celular y es especialmente relevante en trastornos y enfermedades degenerativas que son producidas porque un tipo concreto de célula deja de funcionar, y también en enfermedades monogénicas.

El equipo del Prof. Raya estudió esta aplicación hace unos años en colaboración con los grupos del Dr. Juan Bueren, del CIEMAT, y del Dr. Jordi Surrallés en la UAB. La enfermedad escogida fue la anemia de Fanconi y el primer paso de su trabajo consistió en crear células sanguíneas corregidas genéticamente a partir de células de la piel de pacientes afectados por esta enfermedad genética.

Como recordó Raya, los afectados por esta patología se quedan sin células progenitoras sanguíneas, por lo que no pueden fabricar sangre. “Nuestra hipótesis era que si les podíamos extraer células somáticas a estos pacientes, generar células inducidas pluripotentes y, a lo largo del proceso, corregir la mutación que tienen, que sabemos cuál es, podríamos luego obtener células madre pluripotentes inducidas que no tuvieran la mutación y que pudieran generar células progenitoras de sangre libres de enfermedad. Si lo lográbamos, se podría empezar a pensar en reintroducir estos progenitores de sangre en el paciente para que pudiera producir su propia sangre”, explicó.

Los investigadores demostraron que todos estos pasos eran posibles, con niveles de eficiencia clínicamente importantes, pero también observaron que había problemas que había que abordar antes de que el procedimiento se “hiciera realidad clínicamente”.

Escollos que abordar

Las principales limitaciones que, según Raya, se encontraron en ese momento eran técnicas: la forma en que se generaban las células inducidas, la manera en que se corregía el defecto genético... “Todos estos problemas técnicos se han resuelto en estos últimos cinco años”, apuntó el científico, que añadió que en la actualidad se pueden fabricar células madre pluripotentes inducidas que no tienen ninguna ‘cicatriz’ genómica y se pueden corregir los defectos.

Sin embargo, el investigador destacó que sigue habiendo otros problemas. “Uno muy obvio es que esta



tecnología cuesta muchísimo dinero, por lo que no cabe pensar en la posibilidad de crear una línea de células inducidas por paciente, cada línea cuesta entre millón y medio y dos millones de euros, y no se puede gastar esa cantidad en cada persona, por lo que la logística de este tratamiento avanza cada vez más hacia tratamientos alogénicos”, subrayó el investigador.

Precisamente Shinya Yamanaka fue pionero de un banco de células, que empezó con la población japonesa y el año pasado se anunció que iba a ser global y que cubriría a la mayor parte de la población del mundo.

Sin embargo, sigue habiendo al menos un escollo común a cualquier tratamiento nuevo que se quiera introducir: la seguridad. Según destacó el investigador, la pregunta es si la introducción de estas iPS podría causar más daño que bien al paciente. Sobre este asunto ha habido muchos ensayos preclínicos que han intentado identificar estrategias terapéuticas que minimicen el posible riesgo, sobre todo de cáncer asociado; los datos preclínicos han mostrado que existen estrategias que pueden eliminar o minimizar este riesgo.

Ensayo clave

En la actualidad hay un ensayo clínico en marcha que se anunció hace un año y medio y empezó a reclutar pacientes el año pasado. Se trata de un estudio que se está haciendo en Japón para estudiar el uso de iPS en el tratamiento de la degeneración macular. Liderado por Masayo Takahashi, del Instituto Riken, consiste en inyectar en la retina de los pacientes afectados un tipo específico de célula obtenido de iPS.

Si este ensayo clínico demuestra que no hay problemas de seguridad, muchos más se pondrán en marcha en los próximos meses. Aun así, quedan varias cuestiones biológicas pendientes, señaló Raya, porque estas células iPS pueden generar cualquier tipo de célula en el organismo, pero no se sabe cómo diferenciar esa célula específicamente para desarrollar el tipo de célula que se necesita y que se pueda integrar en el paciente.

“Si el estudio de Takahashi demuestra la seguridad de las iPS, se pondrán en marcha muchos otros.”

“En general, en el campo tenemos protocolos para generar dos o tres tipos de células que puedan trasplantarse a pacientes, el resto no podemos fabricarlas todavía. En nuestro caso nos interesa generar cardiomiocitos y podemos desarrollar células que tienen aspecto de cardiomiocito y fabricar entidades que lo parecen o ‘miniórganos’. Sin embargo, esto es únicamente investigación básica. Para los pacientes necesitaríamos miles de millones de células funcionales lo bastante maduras para integrarse y las que podemos fabricar ahora mismo sabemos que no cumplen todavía los requisitos”, resumió el investigador.

Un estudio reciente de los grupos de Michael Laflamme y Charles Murry, de la Universidad de Washington, ha demostrado la posibilidad de generar millones de cardiomiocitos y, en concreto, llegó a integrarlos en un modelo animal de mono. Los investigadores demostraron que si las células generadas se inyectan en el órgano del animal viven más de tres meses y se acoplan mecánicamente con su miocardio; el problema es que estas células no maduran lo bastante y producen arritmias, una dificultad que están intentando solucionar en la actualidad. Al promover la maduración de estas células, han tenido la oportunidad de analizar su cultivo y la promoción de su maduración.

Para mejorar dicha maduración, los investigadores dirigidos por el Dr. Raya están usando dos tipos de estrategias: la primera consiste en utilizar andamios tridimensionales para su diferenciación; su tamaño es aproximadamente de un centímetro, aunque pueden ser más grandes y tener la dimensión que se quiera.



“Una vez inyectados en el corazón del mono, los cardiomiocitos generados producen arritmias.”

En ellos se cultivan las células en perfusión continua, en biorreactores, y se ha observado que, tras su cultivo, son capaces de proliferar y poblar el andamiaje sobre el que se apoyan. “Lo que hemos visto es que si ponemos progenitores muy poco diferenciados, no pueden llegar a madurar, diferenciarse y convertirse en cardiomiocitos, pero si ponemos progenitores derivados de iPS que sí están ya diferenciados de la forma adecuada, sí pueden madurar”, comentó el investigador del IBEC.

La forma de implantar estas células es una técnica desarrollada por el Dr. Antoni Bayés-Genís en Barcelona, que consiste en descelularizar el pericardio y liofilizar el material para, a continuación, rehidratarlo y, posteriormente, implantarlo y reintegrarlo en el órgano original. El procedimiento se ha probado en cerdos para tratar el infarto de miocardio y se ha visto que sí se integran en el miocardio subyacente, se revascularizan y se innervan. Los autores están ahora esperando los resultados de combinar los andamiajes para ver si las células resultantes son capaces de mejorar la función del miocardio. Aunque se sabe que esto sucede, quieren analizar si se puede mejorar aún más, evitando problemas asociados a la inmadurez de las células implantadas, como la aparición de arritmias.

Para la segunda estrategia, han probado amadurar las células en estructuras de hidrogel 3D; en un principio, sospechaban que el grosor podría ser un problema, pero se ha visto que las células crecen bien y la ventaja es que con estos hidrogeles se las puede estimular de forma mecánica y también eléctrica. Si se hace así, las células se alinean y maduran hasta dejar de latir espontáneamente, lo

cual es un signo de madurez. Sin embargo, estas estructuras responden adecuadamente cuando se estimulan, latiendo sincrónicamente hasta 3 Hz sin mostrar ningún tipo de arritmia. Estos hidrogeles pueden ser disueltos e inyectados en el miocardio posteriormente.

Modelo de enfermedad

El tercer uso de la tecnología de células iPS es modelar la enfermedad en humanos. En este caso no se trata de generar estas células para luego diferenciarlas en células que se utilizarán en pacientes, sino que lo que se pretende es conseguir células enfermas para estudiar la enfermedad en placas y obtener información sobre cómo se produce y cómo se puede prevenir.

“La tecnología iPS se ha utilizado para modelar docenas de enfermedades hasta la fecha y si se intenta modelar una enfermedad humana que es monogénica de inicio precoz, lo normal es que se pueda lograr con bastante éxito”, apuntó el Prof. Raya.

El equipo del investigador, sin embargo, ha ido más allá intentando modelar otras más complejas, como la enfermedad de Parkinson. Hacerlo ha sido todo un reto por varios motivos: uno es porque la enfermedad en sí tarda décadas en manifestarse en el paciente, algo que, según subrayó, es muy difícil reproducir en el laboratorio. Otra razón por la que resulta un desafío es que la base genética de la enfermedad es compleja y desconocida en muchos casos, aunque existe una minoría de los casos, entre el 10 y el 15%, que se presenta en familias.

En un trabajo desarrollado en colaboración con los grupos de Antonella Consiglio, en el Instituto de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, Eduardo Tolosa, en el Hospital Clínic de Barcelona, y Miquel Vila, en Vall d’Hebron, los investigadores seleccionaron cuatro individuos control, siete con Parkinson idiopático y cuatro con mutaciones en el mismo gen, *leucine-richrepeat kinase-2 (LRRK2)*. A continuación desarrollaron células iPS a partir de células de los



pacientes, que fueron capaces de generar neuronas dopaminérgicas. “Observamos que las células dopaminérgicas de los pacientes con mutaciones, pero no las de los esporádicos, acumulaban α -sinucleína de una forma anormal. Esto no es sorprendente porque la interacción de estos dos genes particulares ya había sido descrita, pero nos dio la oportunidad de estudiar cómo la α -sinucleína se acumula en las neuronas de los pacientes que tienen mutaciones en el *LRKK2*”, subrayó el investigador.

El trabajo se ha llevado a cabo en colaboración con Ana Cuervo, del Albert Einstein College of Medicine, y los investigadores demostraron que el *LRKK2* se degrada de forma normal por una vía conocida como autofagia mediada por chaperonas. En los pacientes, el *LRKK2* mutante bloquea esta vía, impidiendo también la degradación de otros sustratos, como la α -sinucleína, que por tanto se acumula anormalmente. “Este hallazgo es una ventaja de utilizar este tipo de modelo para estudiar enfermedades”, enfatizó Raya.

También a partir del uso de este modelo, los autores han observado que los pacientes esporádicos sobre los que no se sabía que presentaban ningún tipo de susceptibilidad genética, sí la tienen. Lo comprobaron al diferenciar sus células y mantenerlas en cultivo durante un largo período de tiempo y observar que mostraban neurodegeneración, al contrario que los individuos del grupo control. La causa de esta susceptibilidad aumentada a neurodegenerar tras largos tiempos en cultivo debe de ser compleja, pero ha sido capturada en las células iPS generadas de los pacientes y aparece al diferenciarse éstas en neuronas dopaminérgicas.

Aunque el Prof. Raya reseñó que no se ha encontrado ningún gen ni polimorfismo concreto, destacó que sí se habían visto numerosas marcas epigenéticas: “hasta 2000 regiones distintas metiladas en todo el genoma, que no estaban presentes en los fibroblastos ni en las células iPS mismas y sólo se manifestaban cuando se diferenciaban a este tipo de neuronas”. Esta identificación

“Es crucial generar células enfermas para conseguir información sobre cómo prevenir y curar ciertas enfermedades.”

se ha llevado a cabo en colaboración con los grupos de Eduardo Tolosa y Mario Ezquerra, del Hospital Clínic de Barcelona, e Iñaki Martín-Subero, de la Universitat de Barcelona. De hecho, se ha llegado hasta a identificar un pequeño módulo de factores de transcripción que pueden ser responsables de estas regiones diferentemente metiladas.

Etapas nunca vistas

Más allá de los usos tradicionalmente identificados derivados de las iPS, el Prof. Raya quiso mencionar una utilidad que, a su juicio, es más conceptual. Para el investigador, si se consigue generar células enfermas del paciente utilizando esta tecnología –lo que ya se está haciendo en el laboratorio–, se obtienen neuronas dopaminérgicas exactamente iguales a las que tenía el paciente cuando nació, cuando no había enfermedad.

“Si esto se confirma, podremos analizar fases o estadios de la enfermedad que nunca hemos visto en los pacientes, porque ocurren antes de que den síntomas, además de utilizar esta tecnología para identificar mecanismos de la patología que sí se han visto en los enfermos”, subrayó el investigador, que puso un ejemplo de una posible puesta en práctica de esta función: la organización de redes complejas de neuronas, estudiando su funcionalidad a lo largo del tiempo, llevada a cabo en colaboración con el grupo de Jordi Soriano en la Universitat de Barcelona. Así se podría analizar cómo la actividad de una neurona influye en la de las otras neuronas, cómo de complejo es el proceso y cuál es la estructura de dicha red.



“Esta tecnología se puede usar para detectar alteraciones funcionales antes de que las muestren las neuronas de los pacientes.”

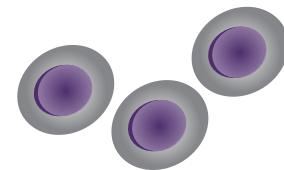
Se podría, por lo tanto, utilizar esta tecnología para detectar alteraciones funcionales antes de que las neuronas presenten los fenotipos que se han descrito en los pacientes. Esto es precisamente lo que estos investigadores están haciendo en el contexto de una enfermedad lisosomial rara que cursa con retraso mental, en colaboración con el grupo de Daniel Grinberg y Lluïsa Vilageliu en la Universitat de Barcelona.

“Si la enfermedad es causada por una mutación genética, podemos ver exactamente qué hace una proteína mutada en el contexto de la célula afectada por la enfermedad, con el complemento de otras proteínas que están normalmente en esa célula”, apuntó Raya, que señaló también que, de esa forma, se podrían cribar fármacos que o bien revirtieran los fenotipos vistos en los pacientes o bien los evitaran.

En sus conclusiones, el Prof. Raya recordó las tres áreas principales de aplicación médica de las células iPS por el momento: la primera es comprender la reprogramación, que es algo que aportará sus beneficios con respecto a la salud humana en el futuro. “De momento, aumenta nuestra comprensión de mecanismos celulares muy básicos”, apuntó.

La segunda es encontrar estrategias para utilizar iPS para curar a los pacientes e introducir las en la práctica clínica, lo cual depende básicamente de encontrar la forma de diferenciar las iPS a células especializadas que sean suficientemente funcionales y de los ensayos de seguridad que se están realizando. Si esos ensayos no muestran toxicidad o demuestran que ésta se puede controlar, entonces empezarán a llevarse a cabo otros del mismo tipo y esta tecnología se utilizará a corto plazo para tratar problemas terapéuticos específicos.

Por último, muchos laboratorios están ya utilizando los modelos de enfermedad, obteniendo las células que enferman para reproducir los mecanismos y también para ver cuáles son los fármacos que pueden revertir o incluso prevenir la enfermedad.



Regeneración pluripotente independiente de órganos estables mediante inducción vascular

Shahin Rafii

Investigador del Instituto Howard Hughes de Medicina, miembro de la Sociedad Americana de Investigación Clínica y catedrático de Medicina Génica en el Weill Cornell Medical College de Nueva York

La medicina regenerativa va más allá de la utilización de células madre pluripotentes inducidas (iPS). Se están investigando otras alternativas y una de las más prometedoras es la de regenerar tejido a partir de la producción de células endoteliales y su posterior implante en los distintos órganos, campo en el que trabaja el Prof. Shahin Rafii. Se trata de una perspectiva distinta en torno a la medicina regenerativa, pero en la que también se están produciendo avances significativos.

Una de las razones para estudiar esta hipótesis, que consiste en inducir el crecimiento de las células endoteliales, que componen los vasos sanguíneos, para fomentar la regeneración pluripotente es, precisamente, la debilidad observada en los otros métodos que se están estudiando para regenerar tejido.

Según subrayó el Prof. Rafii, aunque la ciencia ha demostrado que se pueden obtener células madre tanto a partir de células embrionarias como induciéndolas a partir de células adultas (iPS), lo que ningún estudio ha logrado es que éstas se mantengan vivas y en buen estado tras someterlas a distintas situaciones de estrés, como inflamación, hipoxia u otros factores. Cuando eso sucede, las células pierden su identidad y eso supone un problema importante a la hora de plantear su utilización en la práctica clínica.



Shahin Rafii

Cuando se aborda el problema de la regeneración funcional de los órganos, la inyección de factores de crecimiento específicos para cada órgano sólo ha demostrado beneficios marginales y todavía no se puede hablar de éxito del trasplante de células iPS, ya que aún está bajo ensayo clínico.

Ésta es otra de las razones que justifican una aproximación diferente. La hipótesis del laboratorio que dirige Rafii es que podría ser eficaz trasplantar el endotelio, porque es una estructura que produce factores de crecimiento y es denominador común en cada órgano, por lo que se cree que puede inducir la regeneración tisular.



“Las células endoteliales participan de forma activa en la regeneración de los órganos y el crecimiento de tumores.”

Activas en la regeneración

En la actualidad, al definir las células endoteliales, se piensa en ellas como en estructuras que revisten los vasos sanguíneos y se ven por lo tanto como un conducto pasivo que administra oxígeno y nutrientes. Pero los investigadores dirigidos por Rafii han demostrado, sin embargo, que participan de forma activa en la regeneración de los órganos y desempeñan un papel importante también en el crecimiento de tumores. De una forma independiente a la perfusión, las células madre del endotelio pueden promover la regeneración sin provocar una fibrosis de mala adaptación, un problema importante que la ciencia trata de evitar en torno a la medicina regenerativa.

Las células madre en muchos órganos están cerca de estas células endoteliales y reciben señales, denominados factores de crecimiento angiocrinos. Por otra parte, se ha demostrado la plasticidad del endotelio adulto, lo que apoya la hipótesis de que éste pueda convertirse en una alternativa a las iPS; por alguna razón aún desconocida, el genoma endotelial es mucho más plástico y puede ser repoblado de una manera que no se ha logrado con las iPS ni las células madre embrionarias.

Se ha observado que el endotelio de cada órgano produce factores de crecimiento tanto durante el reposo o durante el estrés, algo que está regulado por factores de transcripción específicos que se activan en el endotelio concreto de cada órgano. Además de las claves microambientales, los factores de transcripción regulan la generación del endotelio específico de cada órgano.

Ante esta situación, Rafii se preguntó por qué las células madre mesenquimales se han trasplantado y las del endometrio no. Su respuesta fue que el problema es que estas células son muy difíciles de cultivar, de expandir y mantener su factor de crecimiento endógeno. Una de las principales áreas de trabajo de este científico consiste en desarrollar tecnologías para cultivar células endoteliales sin suero, un producto de sangre coagulada, lleno de TGF-beta, factor de crecimiento venenoso para las células madre y las endoteliales. Pero, según ha demostrado el equipo de este científico, si se introduce un adenovirus no oncogénico –E4ORF1– en las células endoteliales, éste recoge la proteína *Akt* a niveles muy bajos, activa las células endoteliales, las expande y fisiológicamente pueden responder a factores de crecimiento como EFG o BF manteniendo su firma original al 5%.

Apuntó Rafii que, con el uso de esta tecnología, se puede cultivar cualquier tipo de endotelio de distintos órganos sin contaminar el endotelio linfático. Para dar un ejemplo de la capacidad de la célula endotelial para interactuar con células madre, llevaron a cabo un estudio para ver si el endotelio de la médula ósea soportaba la expansión de estas células sin presencia de factores de crecimiento. Fue un trabajo en colaboración con Jason Butler –también de la Universidad de Cornell–, que les permitió comprobar que las células endoteliales interactuaban y se expandían masivamente a partir de células madre progenitoras. De hecho, no son eran células madre, sino que producían factores de crecimiento diferenciados.

Productoras de factores de crecimiento

Las células endoteliales pueden, por lo tanto, producir factores de crecimiento capaces de acoger a las células madre y permitir su regeneración. Este efecto se ha conseguido inyectando iPS en ratones, pero se ha visto que la mayor parte contraía cáncer de tiroides, indicó Rafii.



Sin embargo, las células endoteliales se han mostrado capaces de expandir las células hematopoyéticas de la médula ósea en un modelo animal de mono. Así lo comprobaron en un experimento en el que se comparó la médula de esos monos con las de animales que no habían recibido el trasplante de células en el endotelio y se observó que al año dichas células se habían multiplicado, lo que demostraba por lo tanto la capacidad regenerativa del endotelio.

Esto mismo lo lograron demostrar los científicos de la universidad estadounidense con células pulmonares y células hepáticas. “No cabe la menor duda de que las células endoteliales producen estos factores de crecimiento que causan la regeneración de los distintos órganos”, subrayó Rafii.

Otra característica de las células endoteliales y que es muy importante para la medicina regenerativa es que son capaces de modular el nivel de fibrosis tisular. En el artículo “Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis” (*Nature*, 2014), el equipo de Rafii demostró que estas células logran regenerar el hígado sin fibrosis y que pueden decidir entre regeneración celular con o sin fibrosis. Las células endoteliales, además de los fibroblastos, pueden dictar la decisión de formar fibrosis. “Les puedo garantizar que se pueden diseñar células endoteliales que sean menos tendentes a hacer fibrosis y más regenerativas”, apuntó el científico.

Sin respuesta al estrés

Otro experimento que se ha hecho en su laboratorio es trasplantar endotelio pulmonar en el pulmón de ratones y, con ello, han logrado regenerar el pulmón; sin embargo, si se trasplantaba endotelio hepático en el mismo modelo, se vio que no se acoplaba y no regeneraba. Esto demuestra, a juicio de Rafii, que si se quiere llevar esta técnica a la práctica clínica, ha de hacerse con células endoteliales propias de cada órgano.

Ya que las células endoteliales son denominador común en todos los órganos, es posible diseñar por

“Se puede cultivar cualquier tipo de endotelio de distintos órganos sin contaminar el endotelio linfático.”

ingeniería genética endotelio específico de cada órgano, trasplantarlo de forma intravenosa y elegir el “código postal” correcto para que produzca el factor angiocrino correcto y cause regeneración orgánica. Pero, para ello, es necesario definir los factores de transcripción que permitirían este proceso y generar endotelio genérico en el que poner estos factores de transcripción, lo que primero habría que probar en modelos de ratón y de mono. “Nuestro esfuerzo ha resultado en un endotelio aún inestable, pero diez veces más estable que con la reprogramación directa”, comentó Rafii.

La cuestión que ha desafiado la biología del desarrollo durante décadas es cómo el endotelio específico de cada órgano consigue ser único. ¿Es porque hay factores de transcripción que hacen único a un endotelio genérico? No hay duda de que hay fuerzas biomecánicas que impiden la elasticidad.

Basándose en este hecho, el equipo de Rafii ha desarrollado la hipótesis de que son distintas actividades las que dotan de vascularidad específica a cada órgano. Y precisamente para estudiar esto es para lo que considerar que hay que producir endotelio genérico. Es algo que se ha intentado hacer inicialmente a través de iPS. El experimento tuvo éxito, porque estas nuevas células endoteliales crecieron en cultivos celulares, los científicos las pudieron expandir y dieron lugar a un tejido muy similar al endotelio. Sin embargo, las células no fueron capaces de alcanzar la madurez, sobre todo si se enfrentaban a cualquier tipo de estrés por endotoxinas, como la hipoxia.



“Las células endoteliales producen los factores de crecimiento que causan la regeneración de los órganos.”

“Los últimos dos años hemos hecho endotelios clónicos a partir de células derivadas de iPS. Tras analizarlos, hemos visto que tienen la firma completa del endotelio. Sin embargo, si colocamos monocitos encima de estas células endoteliales derivadas de iPS, se parecen a las endoteliales originales; pero, al amenazarlas con hipoxia, se convierten en otro tipo de célula y también adquieren muchos otros rasgos”, reflexionó Rafii, que añadió que este mismo efecto se ha demostrado con muchos otros tejidos, incluido el hematopoyético y el cardíaco, y se ha observado el mismo fenómeno. “Sin duda, es uno de los problemas fundamentales que tenemos que resolver”, apuntó.

Células amnióticas

En este sentido, los científicos han elaborado un abordaje alternativo. La hipótesis es que una célula amniótica puede haber pasado por este proceso epigenético. En un estudio publicado en *Cell* en 2012, los investigadores dirigidos por Rafii convirtieron células amnióticas maduras en células endoteliales mediante factores de transcripción y la supresión de TGB-beta.

Con este sistema fueron capaces de obtener un endotelio muy estable que en condiciones de estrés no pierde su estabilidad vascular. Llevaron a cabo este procedimiento con distintos tipos de células reprogramadas, incluidas las iPS y las amnióticas y observaron que los derivados de iPS reaccionan peor, se convierten en células no vasculares. Pero, con el nuevo procedimiento, se ha intentado generar células hematopoyéticas funcionales y se han visto importantes avances.

La siguiente fase del trabajo consistió en reprogramar células endoteliales en precursores de células hematopoyéticas, lo que se hizo mediante la inducción de nicho vascular y con ello se consiguió una repoblación escalable de células endoteliales reprogramadas.

“Lo más importante de este trabajo es que observamos que el nicho vascular toma las decisiones ejecutivas de la inducción y sostenibilidad de la hematopoyesis”, señaló Rafii.

El investigador de origen iraní concluyó su conferencia con una reflexión sobre las iPS, células a las que definió como “muy útiles para entender la biología vascular”. Sin embargo, advirtió, quedan muchos problemas por resolver: el primero, que las iPS de adultos pueden tener un 70% de mutaciones mitocondriales del ADN y queda mucho por saber sobre cómo se hace la transición de pluripotencia a conversión directa. La reversión a estado pluripotente a veces puede producir oncogénesis y borrar la huella genética y es un proceso sobre el que hay aún muchos interrogantes abiertos.

Pero la reprogramación directa también presenta muchos problemas, ya que puede ser ineficiente e incompleta, y hay datos que demuestran que gran parte de la memoria original de los fibroblastos no queda totalmente eliminada porque no hay un factor que garantice dicha eliminación.

Por esta razón, Rafii apuntó a que la solución puede estar en las células amnióticas reprogramadas en una fase intermedia de la gestación. Esto supondría, en cierto modo, empezar desde cero, pero el investigador cree que es algo necesario para intentar solucionar el problema de la huella genética. “Si podemos encontrar el origen primitivo de la conversión de las células o de sus precursores, podríamos aplicarlo a la conversión directa”, subrayó.

La pregunta que surge a partir de esta hipótesis es por qué las células amnióticas tienen este estado cromatínico tan singular [las moléculas de ADN se encuentran



expandidas, en forma de filamentos, ocupando todo el espacio del núcleo]. Según comentó Rafii, en el estado pluripotente va a llevar muchos esfuerzos seguir cada línea de cada gen específico. Por otro lado, la cromatina es demasiado rígida en los adultos; muchas cromatinas están condensadas y es dificultoso desenmarañarlas.

La clave ausente

Sin embargo, el investigador opina que si la ciencia se centra en el estudio de las células fetales en fase media de la gestación, se pasa de este estado pluripotente a una fase intermedia; las células están a medio camino, lo que puede ser la clave que falta en la reprogramación celular.

Por último, Rafii advirtió de que, aunque se está avanzando mucho en el campo de las células iPS, no se deben olvidar las células madre de adulto. “Todos tenemos células madre, hay señales que pueden ayudarlas a regenerarse y tenemos que capturar esas señales y desarrollar modelos y sistemas que nos permitan ampliarlas”, comentó. A juicio de este científico, la transición a estado pluripotencial inhabilita a las células en términos de su respuesta al estrés fisiológico y hasta ahora no se ha podido desarrollar una línea endotelial muy estable.

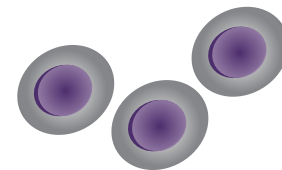
Esto cambia con los resultados de sus experimentos ya que, opinó, las células amnióticas reprogramadas en células endoteliales vasculares maduras y funcionales

“En la biología de las células amnióticas está el secreto del desarrollo fetal.”

(RAC-VEC) son muy estables y resistentes, y garantizan una estabilidad epigenética. Pero sigue quedando una pregunta sin responder y es cómo desarrollar o conseguir células autólogas amnióticas. Aunque ya se ha demostrado que para reprogramarlas, se pueden utilizar distintos factores de transcripción como ETV2 o ERG1, el problema sigue siendo cómo obtener esta célula amniótica.

La respuesta que propone Rafii es utilizar muestras de las más de un millón de amniocentesis que se llevan a cabo en el mundo al año. El científico justifica esta propuesta en que cuanto más se entienda la biología de estas células amnióticas más se sabrá sobre el desarrollo fetal, que definió como “una especie de caja negra del organismo”.

En la actualidad, se desconocen casi todos los aspectos epigenéticos del desarrollo amniótico y Rafii apunta a que cuando se sepa más sobre este asunto, los científicos serán capaces de desarrollar endotelio específico de cada órgano que podrá ayudar en la anhelada regeneración tisular.



Uso de la reprogramación directa para la reparación neuronal

Sergio Gascón

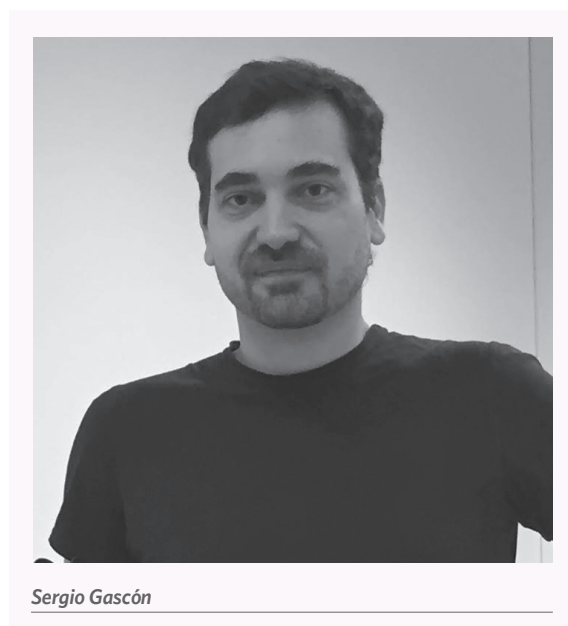
Investigador de la Universidad “Ludwig-Maximilians” de Munich y el Instituto de investigación de células madre en el centro Helmholtz-Munich, Alemania

Al contrario que en otras especies, el cerebro de los mamíferos no tiene la capacidad de autorrepararse. La razón principal es que este órgano carece de progenitores capaces de regenerar las neuronas perdidas tras un daño cerebral. Según recordó el Dr. Sergio Gascón, sólo existen progenitores en dos áreas muy específicas del cerebro: el ventrículo lateral y el hipocampo. Sin embargo, su reducido número hace inviable su utilización desde el punto de vista clínico.

Ante este problema, y dado el impacto social que tienen las enfermedades relacionadas con el sistema nervioso, se han puesto muchas esperanzas en la reprogramación de fibroblastos en células madre pluripotentes inducidas (iPS, por sus siglas en inglés, *induced pluripotent stem cells*) y convertirlas en neuronas mediante diferentes métodos.

Una posible aplicación clínica de esta metodología consistiría en extraer fibroblastos de la piel de un paciente, cultivarlos en el laboratorio y reprogramarlos a células pluripotentes. Después, estas células madre inducidas serían diferenciadas en precursores neuronales, que pueden trasplantarse en el área lesionada del cerebro en la que se requieran.

No obstante, el riesgo que conlleva el trasplante de células madre indiferenciadas en pacientes humanos es demasiado elevado como para justificar la escasa repercusión clínica observada en los estudios realizados en el pasado. Ejemplos de estos problemas son la for-



Sergio Gascón

mación de tumores inducidos por las células iPS y la baja eficiencia de conversión neuronal obtenida en casos clínicos reales. Aunque hasta ahora estas barreras técnicas han dificultado enormemente la aplicación de esta tecnología en clínica, recientes descubrimientos han abierto nuevas esperanzas en el tratamiento de enfermedades neuronales basadas en la reprogramación celular. La nueva idea consistiría en la conversión de un tipo celular en otro distinto sin que se requiera la adquisición de una fase intermedia de pluripotencia. Este proceso se conoce como “conversión directa de linaje” o “reprogramación directa”.



“El trasplante de células madre indiferenciadas puede inducir la formación de tumores.”

Ventajas de la reprogramación directa

Según apunta Gascón, de entre las distintas aproximaciones a la regeneración neuronal, la reprogramación directa parece tener algunas ventajas importantes: en principio, no se necesitaría extraer células de otros tejidos, sino que se podrían utilizar las células supervivientes que ya están en el área lesionada del cerebro (mayoritariamente células gliales), y que se podrían establecer como células diana, en las que se insertarían los genes necesarios para forzar su reprogramación a neuronas y, por tanto, inducir la regeneración del tejido cerebral desde dentro.

“La gran ventaja de la reprogramación directa es que no hay que pasar por la conversión a iPS”, comentó Gascón. Se trataría de un proceso más corto, sencillo y eficiente. Además, la reprogramación directa evitaría el riesgo inherente a las iPS, que, por su condición de células muy proliferativas y no diferenciadas, pueden ser oncogénicas y, por lo tanto, generar cáncer.

Una vez establecidas las teóricas ventajas de la reprogramación directa sobre el uso de iPS en regeneración neuronal, queda por contestar la pregunta clave de si es viable transformar células gliales residentes del cerebro en neuronas.

Gascón subrayó que es un hecho demostrado que las células iPS pueden ser diferenciadas a neuronas en el laboratorio. También se sabe que estas células pueden ser trasplantadas in vivo y dar lugar a neuronas capaces de sobrevivir durante largos períodos de tiempo en el cerebro de un ratón. “En la bibliografía se ha mostrado que esto es posible en modelos animales, pero su aplicación clínica en humanos aún no está demostrada”, comentó el investigador, que también aña-

dió que las nuevas células trasplantadas en el cerebro de ratones sobreviven, se integran en la red cerebral y pueden reducir la sintomatología de modelos específicos de lesión cerebral.

Pero también la reprogramación directa se ha demostrado posible. Es algo que ha llevado el propio Gascón en el laboratorio de Magdalena Götz, en la Universidad de Munich. “Primero lo hicimos in vitro con astrocitos, una de las células gliales más numerosas en el cerebro.”

Lo que los investigadores hicieron fue cultivar in vitro estos astrocitos e infectarlos con retrovirus que introducen genes específicos en las células que infectan, obligándolos así a convertirse en neuronas funcionales, capaces de establecer sinapsis y transmitir impulso nervioso.

Más tarde, otros grupos demostraron que esto mismo podía hacerse también con fibroblastos obtenidos de la piel de muestras humanas aisladas de pacientes.

Mejorar la eficiencia

Pero una vez demostrado que estos experimentos se pueden llevar a cabo in vitro, faltaba responder a la cuestión de si el mismo proceso se podía repetir in vivo. “Lo que nosotros y otros equipos científicos hemos demostrado es que es una hipótesis factible. Las células gliales pueden reprogramarse in vivo y las neuronas resultantes crecen, sobreviven, desarrollan sinapsis y se conectan con otras neuronas residentes del cerebro”, puntualizó Gascón, que, sin embargo, cree que queda por responder una cuestión clave y es si dichas células se podrán utilizar en el futuro para reducir la sintomatología de una patología cerebral específica en humanos.

“Las células iPS pueden ser diferenciadas y trasplantadas, dando lugar a neuronas capaces de sobrevivir en el cerebro.”



“En nuestros primeros experimentos observamos que la eficiencia de reprogramación era muy baja y las neuronas mostraban un fenotipo muy inmaduro que difícilmente sirve para solucionar nada.”

Por esta razón, gran parte del trabajo en regeneración tisular consiste en estudiar métodos para mejorar la eficiencia de la reprogramación. “Una situación deseable sería que a partir de un número concreto de fibroblastos se obtuviera al final el mismo número de neuronas, pero normalmente no es así; la eficiencia de conversión inicialmente era muy baja”, comentó Gascón.

En teoría, ésta se puede mejorar combinando la expresión de muchos genes en la misma célula, ya que cuantos más se utilizaran, más eficiente resultaría la conversión. Pero con las técnicas disponibles es difícil introducir más de dos genes al mismo tiempo en una misma célula. Por supuesto, números del orden de decenas de genes sería impensable, al menos in vivo. Así que la ciencia se centra ahora en entender las barreras que impiden una buena eficiencia en reprogramación sin incrementar el número de genes necesarios para activar el proceso.

Evitar el estrés celular

Precisamente para estudiar dichas barreras, el equipo de Gascón diseñó un experimento que consiste en el *video-tracking* con intervalos de tiempo; se trata de utilizar un microscopio para hacer películas de la conversión y observar cómo los astrocitos se convierten en neuronas in vitro, pero analizando separadamente cada fotograma. Lo que se observó es que, efectivamente, estos astrocitos son capaces de convertirse en neuronas, pero, durante el proceso, la mayor parte de las células mueren. “Hemos observado que la muerte celular es muy importante y limita mucho la eficiencia de reprogramación”, explicó Gascón.

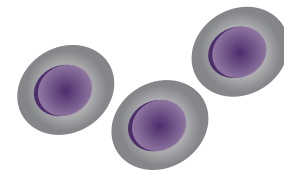
Este descubrimiento inicial proporcionó la clave para mejorar la eficiencia del proceso. “Hemos constatado que durante la reprogramación las células se ven sometidas a distintos tipos de estrés celular. Esto blo-

“Se puede inducir la conversión in vivo de células gliales en neuronas con una eficiencia del 90%.”

quea la conversión al tiempo que provoca la muerte de la mayoría de las células. Con la aplicación de genes y fármacos específicos que reducen tipos específicos de estrés celular, la eficiencia de reprogramación aumenta considerablemente. Ahora somos capaces de inducir la conversión in vivo de células gliales en neuronas con una eficiencia del 90%, en comparación con el 3-30% que conseguíamos anteriormente. Estas neuronas también parecen mucho más maduras, lo que nos da nuevas esperanzas para su aplicación clínica en el futuro.”

No obstante todavía quedan muchas barreras que resolver. Por ejemplo, Gascón apuntó la necesidad de centrarse en los subtipos neuronales específicos que podemos obtener a partir de células gliales. “En una patología como el Parkinson, necesitaríamos neuronas dopaminérgicas; otro tipo de células sería irrelevante. Además, tenemos que conseguir que la integración en la red neuronal sea correcta. Las proyecciones de las nuevas neuronas tienen que dirigirse a áreas concretas del cerebro y no pueden distribuirse al azar”, señaló y volvió a resaltar que el uso generalizado en humanos “está lejos de verse en un futuro cercano”.

Aunque aún no podamos aplicar directamente estos descubrimientos en el tratamiento de enfermedades particulares del cerebro, se trata de grandes avances científicos. Por ejemplo, ahora podemos trabajar fácilmente con neuronas humanas en el laboratorio e investigar modelos de enfermedades neuronales tanto in vitro como in vivo, lo que era impensable hace muy pocos años. Una mejor comprensión de los mecanismos que tienen lugar en las patologías del sistema nervioso acelerará el desarrollo de nuevos fármacos que nos ayudarán a tratar enfermedades concretas



Células madre esqueléticas y sus dobles “mesenquimales”

Paolo Bianco

Doctor en Medicina y Cirugía, Catedrático de Patología en el departamento de Medicina Experimental, Universidad La Sapienza de Roma, Italia

En una misma estructura de hueso, como la cola de un ratón –equiparable a un hueso humano– existen dos tipos de células madre, las hematopoyéticas y las mesenquimales. Como explica Paolo Bianco, esto fue un concepto revolucionario hace aproximadamente 40 años y desde entonces se han publicado alrededor de 27.000 artículos sobre estas células madre esqueléticas y sus dobles mesenquimales.

El concepto fue revolucionario porque conllevaba dos hechos curiosos: el primero, que el progenitor putativo común de distintos tejidos estaba en la médula ósea, que era conocida como el lugar de producción de las células madre hematopoyéticas. En segundo lugar, esto convertía a la médula en el único órgano del cuerpo que estaba dotado de dos tipos de células madre distintas que alimentaban dos clases distintas de tejidos u órganos.

“Ahora sabemos que la biología de las células esqueléticas se basa en un experimento seminal muy sencillo: extraer médula ósea sin hueso o una suspensión de células de la médula ósea y trasplantarlas a un lugar heterotópico en un pequeño mamífero”, explicó el Prof. Bianco, que añadió que dicho experimento se llevó a cabo no para saber si existían células madre en la médula ósea, sino con el objetivo de averiguar si la hematopoyesis se podría trasplantar a un lugar que no hubiera hueso.

La respuesta a esa hipótesis fue ambigua en su momento e hizo falta que pasaran cerca de 40 años para averiguar que lo que había de osteogénico en la médula ósea era una célula no hematopoyética. Además, se observó



Paolo Bianco

que una propiedad de estas células madre esqueléticas es que podían instituir densidad en el crecimiento in vitro o, en otras palabras, que eran clonogénicas y se podían considerar células madre progenitoras. Pero también se vio que la capacidad de formar osículos en un ratón se podía rastrear hacia la progenie de una sola célula clonogénica, implicando que la progenie de una sola célula clonogénica puede diferenciarse en cartilago hueso o grasa.

“Hay más de un tejido en el esqueleto, lo que demuestra la existencia de un progenitor pluripotente en la célula ósea”, subrayó Bianco, que explicó que su equipo ya había demostrado esta tesis tanto en células humanas in vivo como en ratones.



“Hay más de un tejido en el esqueleto, lo que demuestra la existencia de un progenitor pluripotente en la célula ósea.”

Capacidad de renovación

Fruto de su trabajo, ahora se sabe que hay una célula madre que es capaz de autorrenovarse y generar múltiples tejidos esqueléticos en el estroma de humanos y ratones. Estas células residen fuera de los sinusoides, los vasos sanguíneos únicos de la médula ósea, y, como se ha observado en su histología, pueden aislarse de forma prospectiva y generar cultivos.

El Prof. Bianco señaló que es fácil demostrar que las células mesenquimales son dobles esqueléticas porque, al observarlas en el microscopio, revelan una estructura que es una réplica directa del hueso de ratón o de humano, según el ejemplo utilizado. En su arquitectura se puede observar hueso cortical, vasos sanguíneos, una cavidad y células hematopoyéticas que rellenan esta cavidad, y se puede demostrar que el hueso es humano de origen o es una célula endotelial que está formando células óseas en la médula.

Las células mesenquimales que se trasplantan son perfectamente “conscientes” de sus propiedades únicas. “Estas células son únicas en el mundo natural. De hecho, si las denominamos células madre es porque son capaces de organizar tejidos y autogenerarse ellas mismas en cualquier hueso, pero siguiendo la arquitectura adecuada”, resaltó el Prof. Bianco, que subrayó que por eso se alcanza tal grado de “perfección arquitectónica”.

Dos tipos de células

En un experimento en un ratón, se observó que, tras el trasplante, en la cavidad medular convivían dos tipos de células que residían alrededor de los vasos sanguíneos: las esqueléticas, que se ha demostrado que tienen todas las propiedades por fenotipo, y que de hecho se pueden

recultivar y trasplantar, y las células madre hematopoyéticas del ratón huésped. Puesto que no se utilizó ningún andamiaje en este sistema, se pudo fácilmente valorar la dimensión de este fenómeno y demostrar con un simple cálculo que con un volumen de tejido que igual al volumen de un solo trasplante, existen cientos de veces más células hematopoyéticas que las que hay en un volumen igual de sangre periférica del ratón huésped.

Lo que este experimento es, de hecho, es un trasplante de médula ósea inverso, ya que no se trasplanta ningún progenitor hematopoyético en el sistema, pero sí se crea una dosis adicional de médula ósea hematopoyética, solamente por la colonización local de células madre hematopoyéticas circulantes en el órgano creado.

Así, se crea un nicho de este tipo de células madre. El concepto se basa en la idea fundamental de que las células madre están en su propio nicho y que con este sistema las células madre colonizan el organoide; no están localizadas en el nicho de la médula ósea de los ratones, sino que circulan en la sangre periférica y bastan para repoblar todo el sistema.

El experimento pretende resolver una de las preguntas más difíciles que ha planteado la ingeniería tisular durante los últimos 15 años: cuál es la mejor estructura para usar con los progenitores si se pretende reconstruir un trozo de hueso. La respuesta es que el mejor andamiaje es ninguno y que la base del éxito es lo que pueden hacer ellas mismas, porque se inducen a convertirse en una pequeña parte de cartílago antes de trasplantarlas al ratón. Esto no es sólo una ventaja técnica, sino que se puede escalar en la ingeniería tisular, porque indica que también la parte de las funciones que adscribimos al andamiaje puede ser imitada por las células.

“Las células mesenquimales son capaces de organizar tejidos consiguiendo la perfección arquitectónica.”



Displasia fibrosa

El Prof. Bianco abordó también el tema de la displasia fibrosa. En sus trabajos con respecto al origen de esta enfermedad, el equipo italiano observó que se trata de una patología que no se puede curar con células madre porque afecta a estas mismas células. Se trata de una patología monogénica causada por la mutación de un gen, que es el resultado de una secuencia de metilación que sólo se puede producir en un momento particular a lo largo del desarrollo y sólo puede pasar en un momento que precede a la vascularización.

Esto se sabe porque el fenotipo de la enfermedad en humanos implica enfermedades de órganos que proceden de tres capas germinales diferentes y es una prueba inequívoca de que el clon mutado procede de una célula pluripotente y debido al tipo de mutación, ésta no puede empezar hasta que el embrión está en fase de ocho células. La enfermedad es devastadora para el esqueleto, desfigura al paciente, hace que el hueso se vuelva blando, se doble, se deforme y sea quebradizo. Acaba confinando al paciente a una silla de ruedas y provoca déficits sensoriales como pérdida de visión. Se trata de una patología incurable.

El Prof. Bianco y sus colaboradores han trabajado para intentar lograr una cura de esta enfermedad. La hipótesis estudiada era que, al igual que se pueden trasplantar células madre a un ratón y generar hueso nuevo, se debería poder 'fabricar' una réplica del hueso malo in vivo en un ratón con la patología causada por el gen mutado.

Una vez llevado a cabo este experimento, se vio que podía servir para identificar dianas terapéuticas frente a la enfermedad. Se observó que en este hueso, las células endocrinas producían la hormona FGF23 que actúa sobre el riñón, disminuye el fosfato y causa raquitismo y osteomalacia, lo que afecta a un subconjunto de los pacientes, aquellos con la mayor carga de enfermedad.

“La displasia fibrosa es una enfermedad del desarrollo que afecta a las propias células madre.”

Corrección del gen

Los investigadores italianos están utilizando células madre ex vivo para corregir el defecto del gen que provoca esta enfermedad, algo que no es fácil. “No se trata simplemente de buscar un gen que falta; es una mutación de función en un gen expresado de forma ubicua y el objetivo es corregir una enfermedad sistémica monogénica en el esqueleto humano”, resumió Bianco.

Para acabar con esta enfermedad habría que idear una forma mediante la cual se pueda corregir el defecto del gen y hacerlo en las células madre ex vivo. La estrategia consiste en eliminar específicamente el alelo malo en el progenitor con enfermedad, pero sin dañar sus funciones.

El equipo de Bianco consiguió revertir el fenotipo fundamental en las células madre esqueléticas ex vivo. Pero esto no basta. Hay que conseguir que sistemáticamente las células madre mesenquimales vayan a buscar de forma natural la diana de la lesión. “En ese momento habremos curado la enfermedad”, señaló el investigador.

Sin embargo, esto aún no se ha logrado porque estas células no se pueden inyectar sistemáticamente ya que, al contrario que las células madre, no se integran en la circulación y muchas se eliminan. Así, parece que este tipo de células madre es bueno para hacer un modelo en miniatura de la enfermedad, pero no para tratarla.

Bianco ha logrado generar modelos murinos tan afinados que, al mostrar las imágenes a un cirujano ortopeda, éste diagnosticaba la displasia fibrosa. Sin embargo, esto sólo se puede reproducir bien si se expresa el gen de la enfermedad bajo el control de un promotor constituyente. “Se logra hacer esto, pero sólo a través de



“En el modelo murino de la enfermedad, las células de grasa son las que fabrican los huesos.”

una secuencia de tiempo que abarca toda la vida del ratón”, explicó Bianco.

En otro experimento similar se demostró que si se inyecta el gen enfermo en células pluripotentes y se utilizan dichas células para crear un teratoma o formar cartílago, tanto in vitro como in vivo, se observa una formación ósea y de cartílago totalmente normal.

“Nos llevó cinco años el descubrir este hecho tan sencillo. Todos los ratones que tenían que desarrollar cambios fibrodisplásicos en el esqueleto, primero mostrarían cambios en la cola y después la enfermedad progresaba a lo largo del esqueleto”, subrayó Bianco, que llegó a esta conclusión tras analizar radiografías seriadas de más de 200 ratones.

La clave está en la grasa

La razón fundamental de este efecto es que la cola del ratón es un lugar en el que la cavidad de la médula ósea se llena con células de grasa en un momento muy precoz tras el nacimiento, algo que no se produce en el resto del esqueleto. Así, la enfermedad se desarrolla a partir de los cambios que se producen en la médula. “Esto no se produce si colocamos la mutación bajo el control de un promotor específico de osteoblastos. En ese caso, al final acabamos con un fenotipo que, de hecho, ni siquiera es una enfer-

medad, es un fenotipo de alta masa ósea que ni siquiera se parece a la enfermedad causada por la mutación en los humanos”, aclaró Bianco, que añadió que el gen no causa la enfermedad a través de un efecto en las células progenitoras embrionarias pluripotentes y tampoco a través de las células maduras que forman hueso y que son la progenie de las células esqueléticas madre posnatales.

Los investigadores concluyeron que, en ese modelo de enfermedad, las células de grasa son las que fabrican los huesos. “Podría parecer sorprendente, pero no lo es, porque el efecto de la mutación sobre las células adiposas las convierte en tejido adiposo pardo o marrón”, apuntó Bianco, que además señaló que existe una variedad de osteoblastos inferiores y que funcionan peor, que se reconoce porque expresa un gen que normalmente no está expresado en las células formadoras de hueso, el MGP, el inhibidor local más potente de la mineralización ósea. “Si se expresa en osteoblastos, se genera hueso blando no mineralizado, que es precisamente lo que ocurre en esta enfermedad”, resumió el investigador italiano.

El especialista finalizó su conferencia afirmando que la expresión de este gen en estas células es precisamente “uno de los dos actores claves de la enfermedad”, junto con el gen TNCR. Estos hallazgos implican que estos “actores moleculares” se pueden convertir en dianas directas para probar fármacos contra la enfermedad. La buena noticia es que, además, algunos de esos medicamentos ya existen, lo que va a facilitar los estudios en humanos, aunque aún queda tiempo para este avance.

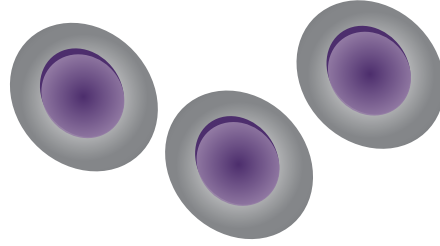
debate

Moderador:

Juan Carlos López

Mesa redonda:

Ángel Raya, Shahin Rafii, Sergio Gascón y Paolo Bianco



Debate

Juan Carlos López: Tras haber escuchado todas las exposiciones, da la sensación de que quedan muchas preguntas por descubrir. ¿Qué creen que es ese reto que, una vez resuelto, hará avanzar de forma aún más espectacular la investigación en medicina regenerativa? ¿Cuál sería el punto de inflexión en este campo?

Shahin Rafii: Aún falta mucho por saber de la biología de las células madre, pero creo que averiguar más sobre las células hematopoyéticas va a ser crucial. En cualquier caso, no se puede hablar de un solo factor clave, sino de una combinación. Hay muchas cuestiones de ciencia básica pendientes de resolver.

Sergio Gascón: La clave está en saber si la célula madre que conseguimos tras la diferenciación se puede o no considerar una célula normal y hasta qué punto le van a afectar los aspectos epigenéticos. En definitiva, poder garantizar que la célula con la que intentaremos reparar un tejido se comporte como debería.

Paolo Bianco: Yo no creo que el gran déficit de conocimiento esté



Shahin Rafii, Sergio Gascón, Juan Carlos López, Paolo Bianco y Ángel Raya.

en saber más sobre la biología celular. Nuestro gran reto, al menos si queremos mantener el nombre de medicina regenerativa en este campo, es precisamente incluir algo de medicina. Debemos aprender cómo encajar lo que ya sabemos de las enfermedades que queremos curar con las células madre al conocimiento que ya tenemos sobre las propias células madre. ¿Podemos usar las células madre como ladrillos para reconstruir tejidos o quizá haya que hacer una aproximación completamente distinta y usarlas

para saber qué fármacos utilizar o a qué dianas deben dirigirse dichos medicamentos? Esto es lo que más urge responder.

Ángel Raya: Deberíamos dejar de llamar célula madre a cualquier célula y dejar de confundir la medicina regenerativa con la terapia celular. Para mí, el reto es entender mejor la diferenciación de las células madre pluripotentes y, para ello, hay que dejar de centrarse en el desarrollo embrionario porque el desarrollo no acaba después del nacimiento y no sabemos muchos so-



bre los cambios posnatales. Cuando entendamos este proceso de diferenciación y lo reproduzcamos, no sólo a base de añadir factores de crecimiento, es cuando seremos capaces de usarlo en la práctica clínica.

Pregunta: *En el Hospital Virgen del Rocío se está procediendo a la regeneración de corazones infartados con células madre. ¿Son las células coronarias más fáciles de regenerar que otras del organismo humano?*

Ángel Raya: Actualmente se están inyectando a pacientes con infarto agudo de miocardio células progenitoras hematopoyéticas, las mal llamadas células madre mesenquimales. Estas células se han utilizado en muchos ensayos clínicos y lo que se ha visto es que no regeneran el miocardio, no producen nuevas células musculares; pero el infarto se acompaña de una inflamación en el tejido y estas células son capaces de segregar factores que modulan esta inflamación de forma que es menor y hay menos células que mueren. Es algo que también ocurre en el cerebro, pero en este caso, más que hablar de medicina regenerativa, tendríamos que hablar de medicina cardioprotectora. Respecto a si las células del músculo cardiaco son más fáciles de regenerar que otras, la respuesta es no, más bien todo lo contrario.

Pregunta: *¿Se ha estudiado el papel de la alimentación como factor de control para el estrés oxidativo?*

Sergio Gascón: No sabemos por qué se produce el estrés oxidativo en nuestros modelos de programación; es algo que aún hay que resolver. Aunque sabemos que muchas enfermedades se producen por estrés oxidativo, aún no se sabe cómo resolverlo, aunque sí que la dieta es importante y que con una buena dieta se reduce el estrés oxidativo, de hecho es la única forma que realmente funciona hasta ahora. Hay algunos tratamientos concretos para Parkinson en los que se ha intentado reducir el estrés oxidativo con fármacos y se ha visto efecto, pero reducir este factor en un organismo entero no es fácil, ya que está relacionado con la mitocondria y el metabolismo y se trata de un asunto complejo.

Pregunta: *¿Qué problemas puede haber en el ensayo que se está llevando a cabo inyectando células madre pluripotentes en la retina?*

Shahin Rafii: Estoy preocupado porque las células iPS que se obtienen en el laboratorio no son móviles en ese entorno porque siguen siendo inmaduras y existe la posibilidad de el sistema inmunológico del ojo no las reconozca. El problema sería que las células derivadas fueran móviles una vez inyectadas en la retina y pasaran del nervio óptico al cerebro

y se alojaran allí. Si esto ocurriera, sería como volver atrás. Creo que se está haciendo muy rápido y espero que haya seguridad, pero creo que aún no sabemos cómo manejar las células que, por su condición, van a seguir queriendo proliferar.

Pregunta: *¿Nos puede explicar algo más sobre el primer ensayo clínico que se está llevando a cabo en Japón?*

Ángel Raya: El ensayo clínico consiste en generar iPS de seis pacientes de degeneración macular que se van a reclutar. Estas iPS se diferenciarán en células de epitelio pigmentario y se les inyectarán en la retina. Hay que aclarar que se trata de un ensayo clínico en fase I, en el que se pretende demostrar la seguridad del procedimiento. Normalmente este tipo de ensayos se hacen en sujetos sanos, pero tiene tanto riesgo añadido que se han seleccionado a personas cuya visión no puede empeorar. Si se demuestra la seguridad del procedimiento, las células de epitelio pigmentario se podrán inyectar en la retina en condiciones beneficiosas, cuando produzcan un soporte para los fotorreceptores que quedan sanos.

Pregunta: *Uno de los riesgos de la utilización de células pluripotentes inducidas es que la proliferación celular puede causar tumoración.*



La Fundación Ramón Areces acogió la séptima conferencia de este ciclo.

res, pero, por otra parte, también existen tumores muy inespecíficos, como el triple negativo de cáncer de mama, y me pregunto si de alguna forma se puede utilizar este proceso que observamos en la enfermedad para hacer otro tipo de reprogramación.

Ángel Raya: Cualquier célula pluri-potente tiene un riesgo de tumorigénesis debido a su capacidad proliferativa, tanto in vitro como in vivo. Frente a los mensajes apocalípticos que se han transmitido, es importante recordar que hay estrategias para evitar esto y, sobre todo, que nadie va a inyectar ningún producto celular a los pacientes si existe el menor riesgo de que pueda formar un tumor.

Juan Carlos López: *A modo de conclusión, ¿cuáles serían sus mensajes finales?*

Ángel Raya: La medicina regenerativa está en una fase de investigación, pero está avanzando muy rápido a aplicaciones clínicas. Respecto a las iPS en concreto, soy consciente de que hay problemas que tratar y el principal es precisamente cómo diferenciarlas. Pero el hecho de que tengan el potencial de diferenciarse es en sí una oportunidad.

Paolo Bianco: Roma no se hizo en un día. Me gustaría transmitir a la sociedad que es importante no apresurarse porque, si lo hacemos, las cosas pueden ir mal. Las esperanzas vienen de ciencia razonada. Hicieron falta 70 años para saber que las células madre hematopoyéticas se fabricaban en la médula ósea y se salva a 50.000 personas al año por esto. Hay que tener paciencia.

Sergio Gascón: Hace falta comprender que cuando hablamos de aplica-

ción clínica, todo el mundo piensa en curar, pero es un proceso lento, primero hay que comprender. Las células madre y la reprogramación van a producir muchos beneficios en el futuro, pero hay que tener en cuenta que hace muy pocos años éramos incapaces de tener neuronas en una placa de Petri y ahora tenemos las células, podemos investigarlas in vitro. No es inmediato, pero estamos avanzando en la dirección correcta, estamos aprendiendo.

Shahin Rafii: No hay que olvidar el potencial de las células madre adultas. Hay que saber la biología de este tipo de células madre, cómo interactúan, cómo se renuevan y no solamente estudiar el papel de las células madre en el desarrollo del feto. Cuanto más nos centremos en la biología básica, más ganaremos para poder trasladar este conocimiento a la clínica.

presentation



Federico Mayor Zaragoza

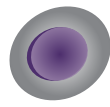
Chairman of the Scientific Council of
the Ramón Areces Foundation

José María Medina

Member of the Scientific Council of
the Ramón Areces Foundation

Javier Cazaña Aguilar

Managing Director of
Nature Publishing Group Iberoamérica



Presentation

We are celebrating the seventh collaboration between the Ramón Areces Foundation and the Nature group, an interesting initiative that is now a part of the regular program of the Foundation.

There is no doubt that this year's theme, regenerative medicine, is the most attractive theme that has been addressed so far for two reasons: first, because of what it represents in the near future; and second, because of what it may represent from not only the scientific point of view but also the clinical one.

I always recall that when D. Ramón Areces created the Foundation that bears his name, his purpose was to approach science precisely to prevent or alleviate human suffering.

The topic chosen for this occasion has these two qualities: it is not only of great scientific interest but also holds the promise of leading to clear clinical applications specifically intended to prevent or mitigate human suffering.

Stem or pluripotent cells are presently one of the most fascinating fields, not only because they offer the possibility of tissue regeneration but also because they have potential for use in genetic disorders that are mediated through epigenetic regulation. In all of these areas, we now have the possibility of making what could be called "mini-organs" through cells, such as cardiomyocytes, hepatocytes, or osteocytes, that have been developed using these systems.

All of this is part of a great present-day panorama that will be shown to us today by excellent scientists who are very conscious of the possible clinical applications of these developments. **|**

Federico Mayor Zaragoza

President of the Scientific Council of the Ramón Areces Foundation



To add to the words of Professor Mayor Zaragoza, I welcome you to this workshop on behalf of the Ramón Areces Foundation. The Foundation's Scientific Council, represented here by Professors Mayor Zaragoza, Villanueva Rodríguez, and myself, has taken a keen interest in organising this workshop.

This event is part of a long and fruitful collaboration between the Nature group and our institution, through which we have organised meetings that were not only very interesting at the time they were held but have also had an extraordinary impact.

For instance, in 2009 the topic of “personal genomes” was discussed. At that time, this issue was considered highly challenging, and it was thought that many of those attending that event would not live to see personal genomes applied in everyday practice. However, today, only six years later, massive sequencing allows personal genomes to be deciphered. Therefore, what previously seemed utopian is already a clear reality.

Over the years, we have also taken up nanotechnology, personalised medicine, autoimmune disease, and type 2 diabetes, the focus of last year's conference. These are all current issues that attract great interest from both scientific and clinical points of view.

On this occasion, we address regenerative medicine, which is a great opportunity for science because it involves a goal that could even qualify as utopian: the possibility of manipulating our cells and constructing tissues or, at least, filling the gaps left by degeneration. This opportunity is also a source of great hope; it may qualify as one of those hopes that perhaps now seem a little distant but, as in the case of personalised genomes, could start to become a reality within a couple of years.

I also want to thank everyone for attending this event; with your attendance, you are collaborating with us to develop the idea that our founder pursued. That idea is the dissemination of Spanish science abroad and foreign science in Spain, including a forum that facilitates contact between one another to establish the necessary synergies we so desire.

Finally, I would like to thank the speakers, especially those travelling from abroad, for participating in what I am sure will be a successful meeting. **I**

José María Medina

Secretary of the Scientific Council of the Ramón Areces Foundation



Welcome to this new conference-debate, which is being held in collaboration with the Ramón Areces Foundation and the Nature Publishing Group Ibero-America, and which is dedicated on this occasion to regenerative medicine.

This year, we celebrate the seventh edition of a format that has allowed the dissemination of advances that have been developed in diverse areas of science through the participation of researchers from the most prestigious centres worldwide.

I would like to thank all the members of the Ramón Areces Foundation who have made this event possible and who are participating today, especially the Scientific Committee represented at this table by Professors Federico Mayor Zaragoza and José María Medina; the Director General of the Foundation, Mr. Raimundo Pérez-Hernández y Torra; and Mr. Manuel Azcona, Communication Director.

I wish to emphasise the role of the Ramón Areces Foundation in the promotion of science and the dissemination of its progress, which allows activities like this one to occur.

This year, we take up a topic with high media impact, an issue that only a few years ago was considered far off, nearly science fiction by the non-scientific community, a public that is now continuously informed on advances through various mainstream media outlets.

A clear example of the growing research in this area is demonstrated by a search of citations over the last 15 years in PubMed, the worldwide search engine for biomedical literature. The total number of citations found between 2010 and 2014 is 68% higher than the number found between 2000 and 2004. In addition, if we limit the search for those periods to the terms “Regenerative Medicine” and “Tissue Engineering”, the increase in citations is 400%.

To understand all of these advances first-hand, this year we have invited four professionals who serve as a point of reference in this type of research. I thank Drs. Ángel Raya, Shahin Rafii, Sergio Gascón, and Paolo Bianco, who have accepted our invitation to participate in this event. As in previous years, the event will be moderated by Dr. Juan Carlos López, former Chief Editor of *Nature Medicine*.

I hope you enjoy this day. |

Javier Cazaña Aguilar

Managing Director of Nature Publishing Group Iberoamérica

introduction



Juan Carlos López

Former Editor of *Nature Medicine*

He received his degree in biomedical research at the Universidad Nacional Autónoma de México and obtained his PhD in neurobiology and behaviour at Columbia University (New York), where he studied the cellular and molecular mechanisms of simple forms of memory in Eric Kandel's laboratory. Before entering the publishing world, Juan Carlos worked for the Instituto Cajal (CSIC, Madrid), studying the functional aspects of inhibitory neurotransmission. In November 1999 he was honoured with the "Estudi General" European Award for scientific dissemination, for his book *El Taller de la Memoria*. He is currently editor in chief of *Nature Medicine*, a post he had held previously at *Nature Reviews Neuroscience*.



Introduction

Thank you very much for inviting me once more; it is a pleasure to come and share my time with the Ramón Areces Foundation and meet with such preeminent scientists as are here with us today.

Although I personally am not highly optimistic about regenerative medicine, on this occasion, talks on what can and cannot be accomplished currently in the field are the most exciting of those presented in recent years, and I hope that an intense debate arises.

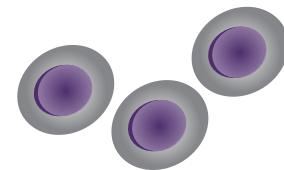
To that end, the four speakers complement each other regarding what exactly we refer to when the issue of stem cells is discussed. There are many types of these cells: mesenchymal, embryonic, induced and other magical ways to turn one type

of cell into another. All play an important role in the scientific field, and we did not want to forget any, so we have intended for the program to include different types of stem cells in different organs. For example, although regenerative medicine has developed considerably in the haematopoietic system, it is also being studied in other fields that pose a greater challenge, such as the nervous, bone and vascular systems.

Thus, our speakers are going to talk to us about different systems and types of stem cells, and I hope that at the end of the afternoon, you will have a better understanding of what the current panorama looks like and what we can expect in the short-, medium- and long-term future. **|**

Lectures

- **BIOMEDICAL APPLICATIONS OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS**
Ángel Raya
Principal investigator of the ‘Control of Stem Cell Potency’ group at the Institute for Bioengineering of Catalonia (Instituto de Bioingeniería de Cataluña - IBEC) and director of the Centre for Regenerative Medicine of Barcelona
- **PLURIPOTENT REGENERATION INDEPENDENT OF STABLE ORGANS BY VASCULAR INDUCTION**
Shahin Rafii
Howard Hughes investigator, elected member of the American Society of Clinical Investigation, and director of the Ansary Stem Cell Institute at Weill-Cornell, New York
- **USING DIRECT REPROGRAMMING FOR NEURONAL REPAIR**
Sergio Gascón
Researcher at the “Ludwig-Maximilians” University of Munich and the Institute for Stem Cell Research at the Helmholtz Centre, Munich, Germany
- **SKELETAL STEM CELLS AND THEIR MESENCHYMAL DOUBLES**
Paolo Bianco
Pathologist and Professor of Pathology at Department of Experimental Medicine, University of Rome “La Sapienza”, Italy



Biomedical applications of induced pluripotent stem cells

Ángel Raya

Principal investigator of the ‘Control of Stem Cell Potency’ group at the Institute for Bioengineering of Catalonia (Instituto de Bioingeniería de Cataluña - IBEC) and director of the Centre for Regenerative Medicine of Barcelona

In 2006, a discovery in mice shook the scientific community. The laboratory of Shinya Yamanaka in Japan demonstrated that somatic cells, initially fibroblasts, could be extracted from a living animal – in this case, a mouse – and reprogrammed to turn them into something that behaved like an embryonic stem cell that could be maintained in the laboratory, and which could propagate indefinitely. Additionally, the cells had the ability to differentiate into any type of cell, and as it was soon demonstrated, a cell of this type could be used to produce living mice. In other words, these were pluripotent stem cells.

This crucial scientific event, which occurred in 2006 in the mouse, immediately raised expectations regarding its clinical implications. Specifically, hope was centred on defining the biomedical applications of induced pluripotent stem cells (iPS), as the cells were named.

As recalled by Prof. Ángel Raya, it was soon demonstrated that this idea could be translated to human cells. Between late 2007 and early 2008, three groups, including Yamanaka’s group, demonstrated that, using a technique very similar to in the one used in the mouse, human somatic cells could also be reprogrammed to closely resemble human embryonic stem cells. “We have invested a great deal of effort into this at our centre; we were the first group in Europe that generated these induced human cells. At that time we used retroviruses to introduce growth factors into cells that



Ángel Raya

would be reprogrammed, the same technique Yamanaka used”, Raya recalled.

At present, there are different ways to introduce those factors. Over a period of time, which in the human case ranges between four and six weeks, the morphology, the transcriptional and epigenetic profiles, and, ultimately, everything that defines the identity of the cell that is reprogramming itself (dermal fibroblasts in this case) takes on the appearance and behaviour of human embryonic stem cells.

This technique is highly robust and has been reproduced in many laboratories. It has been used in many species by employing different techniques to re-



“Cell replacement therapy is especially relevant in degenerative diseases.”

program distinct somatic cell types, and it is currently used by hundreds of laboratories. As Raya explained, different researchers are studying three basic applications: understanding cellular reprogramming; developing cell replacement therapies to treat both degenerative diseases and monogenic diseases; and, finally, modelling human diseases to be able to analyse their pathogenic mechanisms, the genes that cause various pathologies, the onset and progression of disease, and the screening of drug efficacy and toxicity.

Understanding reprogramming and its applications

With respect to the first field, the researcher emphasised that there is currently much research into the use of this technology to understand how reprogramming occurs, how these cells acquire pluripotency, how they acquire identity, and how they escape senescence. “All of this pertains to the field of basic science and the reality is we are gaining valuable information about these mechanisms and how they take place”, Prof. Raya noted.

As for medical applications, what initially caught the attention of scientists was the possibility of using technology to reprogram cells from patients and cause them to differentiate into the cells that the sick person lacks. This is called cell replacement therapy, and it is especially relevant in disorders and degenerative diseases that develop because a specific type of cell stops working, as well as in monogenic diseases.

Prof. Raya’s team studied this application several years ago in collaboration with the groups of Dr. Juan Bueren of CIEMAT and Dr. Jordi Surrallés at UAB. The disease chosen was Fanconi anaemia, and the first

step of their work was to create genetically corrected blood cells from the skin cells of patients with this genetic disease.

As Raya recalled, those affected by this disease are left without blood progenitor cells; therefore, they cannot make blood. “Our hypothesis was that if we could extract somatic cells from these patients, generate induced pluripotent cells, and correct the patient’s known mutation through this process, then we could obtain induced pluripotent stem cells that would not have the mutation and the progenitor cells could produce disease-free blood. If we succeeded, we could begin to consider reintroducing these blood progenitors into the patient so that he or she could produce his or her own blood”, he explained.

The researchers demonstrated that all these steps were possible with clinically significant levels of efficiency, but they also observed that there were problems that needed to be addressed before the procedure “became a clinical reality”.

Pitfalls to address

According to Raya, the primary limitations encountered at the time were technical: the way in which the induced cells were generated and the manner in which the genetic defect was corrected. “All these technical problems have been resolved in the past five years”, the scientist noted, adding that at present, induced pluripotent stem cells can be manufactured that have no genomic ‘scars’ and can correct defects.

However, the researcher emphasised that other problems remain. “One very obvious problem is that this technology costs a great deal of money; thus, it is not possible to consider creating a line of induced cells for each patient. Each line costs between one and a half to two million euros; you cannot spend that amount for each person. Thus, the logistics of this treatment are increasingly progressing towards allogeneic treatments”, the researcher stressed.



Shinya Yamanaka pioneered the concept of a stem cell bank, which began with the Japanese population. Last year, it was announced that the bank would become global, covering most of the world's population.

However, there remains at least one common obstacle to any new treatment being introduced: safety. As the researcher emphasised, the question is whether the introduction of these iPS cells could cause more harm than good to the patient. Regarding this issue, many preclinical studies have attempted to identify therapeutic strategies that minimise potential risks, especially those associated with cancer. Preclinical data have shown that there are strategies that can eliminate or minimise this risk.

Key test

A currently ongoing clinical trial was announced a year and a half ago and began recruiting patients last year. This study is being conducted in Japan to evaluate the use of iPS cells in the treatment of macular degeneration. Led by Masayo Takahashi of the Riken Institute, the trial involves injecting a specific type of cell obtained from iPS cells into the retina of affected patients.

If this clinical trial demonstrates no safety problems, many more will be launched in the coming months. However, Raya noted that several outstanding biological questions remain because although these iPS cells can generate any cell type in the organism, it is unknown how to specifically differentiate that cell to cause it to develop into the type of cell that is needed and that can be integrated into the patient.

“In general, in this field there are protocols to generate two or three types of cells to be transplanted into patients; we are still unable to manufacture the rest. In our case, we are interested in generating cardiomyocytes; we can develop cells that have the aspects of cardiomyocytes, and we can manufacture entities that resemble them or ‘mini-organs.’ However, this is only basic research. For patients, we would need billions of

“If the Takahashi study demonstrates the safety of iPS cells, many others will be launched.”

functional cells sufficiently mature to be integrated. We know that the cells we can manufacture now do not yet meet these requirements”, summarised the researcher.

A recent study by the groups of Michael Laflamme and Charles Murry at the University of Washington demonstrated the possibility of generating millions of cardiomyocytes and, in particular, their ability to become integrated into a monkey model. The researchers demonstrated that when the generated cells were injected into the organ of the animal, the cells lived for more than three months and were mechanically coupled with the myocardium. The problem was that these cells did not mature sufficiently and produced arrhythmias, a difficulty that the researchers are presently trying to overcome. By promoting the maturation of these cells, they have had the opportunity to analyse how to promote their maturation during cultivation.

To improve the maturation of the cells, researchers led by Dr Raya are using two different strategies. The first strategy consists of using three-dimensional scaffolds for differentiation; their size is approximately one centimetre, although they can be larger and be any dimension desired. The cells are cultivated on the scaffolds under continuous perfusion in bioreactors, and it has been observed that after cultivation, the cells are able to proliferate and populate the scaffold they rest upon. “What we have seen is that if we place very undifferentiated progenitors on the scaffold, they cannot mature, differentiate, and become cardiomyo-



“Once injected into the monkey heart, the generated cardiomyocytes produced arrhythmias.”

cytes. However, if we place progenitors derived from iPS cells that are themselves already properly differentiated, these progenitors can mature”, commented the IBEC researcher.

The method used to implant these cells is a technique developed by Dr Antoni Bayés-Genís in Barcelona, which consists of decellularising the pericardium and lyophilising the material, which is then rehydrated and subsequently implanted and reintegrated into the original organ. This procedure was tested in pigs to treat myocardial infarction, and the cells were observed to integrate themselves into the underlying myocardium and become revascularised and innervated. The authors are now awaiting the results of an experiment combining scaffoldings to determine whether the resulting cells are capable of improving myocardial function. Although it is known that this event occurs, they want to analyse whether it can be further improved to avoid problems associated with the immaturity of the implanted cells, such as the development of arrhythmias.

For the second strategy, the researchers have attempted to mature cells in 3D hydrogel structures. At first, it was suspected that thickness might be a problem, but it has been shown that the cells grow well. The advantage of these hydrogels is the ability to mechanically and electrically stimulate the cells, which causes the cells to align and mature until they stop beating spontaneously, a sign of maturity. However, these structures respond adequately when stimulated, beating synchronously up to 3 Hz without showing any arrhythmia. These hydrogels can be dissolved and subsequently injected into the myocardium.

Disease model

The third use of iPS cell technology is to model human disease. In this case, the goal is not to generate these cells for differentiation into cells to be used in patients. Instead, the aim is to acquire diseased cells to study disease plaques and to obtain information on how disease plaques are produced and how to prevent them.

“iPS cell technology has been used to model dozens of diseases so far. If you attempt to model a human disease that is monogenic with early onset, it is normal for this to be achieved quite successfully”, Prof. Raya noted.

The research team, however, has gone further in attempting to model more complex diseases, such as Parkinson’s disease. This research has been quite challenging for several reasons. For example, the disease takes decades to manifest in the patient, a process that is very difficult to reproduce in the laboratory. Another reason is that the genetic basis of the disease is complex and unknown in many cases, although a minority of cases, between 10% and 15%, occur in families.

In a study developed through a collaboration between the groups of Antonella Consiglio at the Institute of Biomedicine of the University of Barcelona, Eduardo Tolosa at the Hospital Clinic of Barcelona, and Miquel Vila at Vall d’Hebron, the researchers selected four control individuals, seven patients with idiopathic Parkinson’s, and four patients with mutations in the same gene, leucine-rich repeat-kinase-2 (LRRK2). They then used the patients’ cells to develop iPS cells that were capable of generating dopaminergic neurons. “We observed that the dopaminergic cells of the patients with mutations, but not those of the sporadic cases, accumulated an abnormal form of α -synuclein. This was not surprising because an interaction between these two particular genes had already been described, but it



gave us the opportunity to study how α -synuclein accumulates in the neurons of patients with LRRK2 mutations”, the researcher stressed.

The work was conducted in collaboration with Ana Cuervo at the Albert Einstein College of Medicine, and the researchers demonstrated that LRRK2 is normally degraded by a pathway known as chaperone-mediated autophagy. In patients, the mutant LRRK2 blocks this pathway, also preventing the degradation of other substrates, such as α -synuclein, which therefore accumulates abnormally. “This finding is one advantage of using this type of model to study diseases”, Raya emphasised.

Using this model also allowed the authors to identify genetic susceptibility in the sporadic patients, for whom no genetic susceptibility had previously been determined. This finding was confirmed by differentiating cells, maintaining them in culture for a long time, and observing neurodegeneration, which did not occur in the individuals of the control group. The cause of this increased susceptibility to neurodegeneration after prolonged culture must be complex, but it has been observed in iPS cells generated from patients and appears when they differentiate into dopaminergic neurons.

Although Prof. Raya outlined that no specific gene or polymorphism has been found, he noted that numerous other epigenetic imprints have been observed: “There are up to 2000 distinct methylated regions throughout the genome, which were not present in the fibroblasts nor in the iPS cells themselves and were only manifested after differentiation into this type of neuron.” This identification has been performed in collaboration with the groups of Eduardo Tolosa and Mario Ezquerro at the Hospital Clinic of Barcelona as well as Iñaki Martín-Subero at the University of Barcelona. In fact, it has been possible to identify a small group of transcription factors that may be responsible for these differently methylated regions.

“It is crucial to generate diseased cells to obtain information about how to prevent and cure certain diseases.”

Stages never before seen

Beyond the traditionally identified uses derived from iPS cells, Prof. Raya highlighted a use that, in his view, is more conceptual. If a researcher succeeds in generating the patient’s diseased cells using this technology, which is already being performed in the laboratory, the dopaminergic neurons obtained are identical to those the patient had at birth, when there was no disease.

“If this is confirmed, we could analyse phases or stages of the disease that we have never seen in patients because they occur before they produce symptoms, in addition to using this technology for identifying mechanisms of the pathology that have been observed in the patients” stressed the researcher. He provided an example of a possible implementation of this feature: complex networks of neurons could be organized, allowing studies of their functionality over time; this work would be conducted in collaboration with the group of Jordi Soriano at the University of Barcelona. Thus, one could analyse how the activity of a neuron influences that of other neurons, how complex the process is, and what the structure of such a network is.

This technology may therefore be used to detect functional alterations before the neurons present phenotypes that have been described in patients. This is precisely what these researchers are developing in the context of a rare lysosomal disease characterised by mental retardation in collaboration with the group of Daniel Grinberg and Lluïsa Vilageliu at the University of Barcelona.



“This technology can be used for detecting functional alterations before they appear in the neurons of patients.”

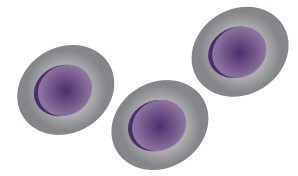
“If the disease is caused by a genetic mutation, we can see exactly what makes a mutated protein in the context of the cell affected by the disease, with the complement of other proteins that are normally in that cell”, noted Raya, who also suggested that this technology could be used to screen for drugs that would revert or prevent phenotypes observed in the patients.

In his conclusions, Prof. Raya recalled the three primary areas of medical application of iPS cells at pre-

sent. The first area is understanding reprogramming, which will bring benefits to human health in the future. “At the moment, it increases our understanding of very basic cellular mechanisms”, he explained.

The second area is finding strategies to use iPS cells to cure patients and introducing these strategies into clinical practice, which basically depends on finding ways to differentiate specialised iPS cells that are sufficiently functional and on implementing safety tests. If these tests show no toxicity or show that toxicity can be controlled, then other tests of the same type will begin to be undertaken, and this technology will be used in the short term to address specific therapeutic problems.

Finally, many laboratories are already using disease models, obtaining cells that produce disease to elucidate their mechanisms and to identify drugs that can reverse or even prevent the disease.



Pluripotent regeneration independent of stable organs by vascular induction

Shahin Rafii

Howard Hughes investigator, elected member of the American Society of Clinical Investigation, and director of the Ansary Stem Cell Institute at Weill-Cornell, New York

Regenerative medicine goes beyond the use of induced pluripotent stem (iPS) cells. Other alternatives are being investigated, and one of the most promising methods is regenerating tissue from the production of endothelial cells and subsequently implanting it in various organs, a field Prof. Shahin Rafii works in. This is a different perspective on regenerative medicine but one that is producing significant progress.

One of the reasons to study this hypothesis of inducing the growth of endothelial cells that make blood vessels to promote pluripotent regeneration is precisely the weakness observed in other methods that are being studied to regenerate tissue.

As Prof. Rafii emphasised, although science has shown that stem cells can be obtained from both embryonic cells and adult iPS cells, what no study has achieved is keeping these cells alive and in good condition after subjecting them to various stresses, such as inflammation, hypoxia or other factors. When that happens, cells can lose their identity, and that is a major problem when considering their use in clinical practice.

When the problem of functional regeneration of organs is addressed, injection of growth factors specific for each organ has only demonstrated marginal benefits, and successful iPS cell transplant is not yet a reality because it is still under trial.



Shahin Rafii

This is another reason justifying a different approach. The laboratory hypothesis that directs Rafii is that it could be effective to transplant the endothelium because it is a structure that produces growth factors and is common in every organ; thus, it is believed that it can induce tissue regeneration.

Active in regeneration

At present, when defining endothelial cells, it is thought that they are structures that line blood vessels and are therefore seen as a passive conduit that delivers oxygen and nutrients. Researchers led by Rafii



“Endothelial cells actively participate in the regeneration of organs and growth of tumours.”

have shown, however, that they are actively involved in the regeneration of organs and also play an important role in the growth of tumours. Independently of perfusion, endothelial stem cells can promote regeneration without causing maladaptive fibrosis, a major problem that science tries to avoid in regenerative medicine.

Stem cells in many organs are close to these endothelial cells and receive signals called angiocrine growth factors. Moreover, plasticity of the adult endothelium has been demonstrated, which supports the hypothesis that these cells can become an alternative to iPS cells; for some yet unknown reason, the endothelial genome is much more plastic and can be repopulated in a way that has not been achieved with iPS or embryonic stem cells.

It has been observed that the endothelium of each organ produces growth factors both at rest and during stress, which is regulated by specific transcription factors that are activated in the specific endothelium of each organ. In addition to microenvironmental keys, transcription factors regulate generation of the specific endothelium of each organ.

Given this situation, Rafii wondered why mesenchymal stem cells have been transplanted but not those from the endometrium. His response was that the problem is that these cells are very difficult to grow, expand and maintain their endogenous growth. One of the main areas of work of this scientist consists in developing technologies for culturing endothelial cells without serum, a product of coagulated blood that is full of TGF-beta, a poisonous growth factor for stem and endothelial cells. However, as demonstrated by

this scientist's team, if a non-oncogenic adenovirus – E4ORF1 – is introduced into endothelial cells, it picks up very low levels of Akt protein, activates endothelial cells and expands them, and they can physiologically respond to growth factors such as EGF or BF, maintaining their original signature at 5%.

Rafii noted that with the use of this technology, any type of endothelium from various organs can be grown without contamination with lymphatic endothelium. To test the ability of endothelial cells to interact with stem cells, a study was conducted to see if bone marrow supported expansion of these cells without the presence of growth factors. It was a collaboration study with Jason Butler – also from Cornell University – that allowed them to establish that endothelial cells interacted and massively expanded from progenitor stem cells. In fact, they not only acted as stem cells, but they also produced differentiated growth factors.

Producers of growth factors

Endothelial cells may therefore produce growth factors capable of accommodating stem cells and allowing their regeneration. This effect has been achieved by injecting iPS cells in mice, but it was observed that most of the mice developed thyroid cancer, Rafii stated.

However, endothelial cells have been shown to be capable of expanding haematopoietic cells in the bone marrow of a monkey animal model. They tested them in an experiment in which the marrow of these monkeys was compared with those from animals that have not received the transplant of cells in the endothelium, and it was observed that within a year, these cells had multiplied, thereby demonstrating the regenerative ability of the endothelium.

Scientists from an American university were able to achieve the very same thing with lung and liver cells. “There is no doubt that endothelial cells produce these growth factors that cause regeneration of various organs”, said Rafii.



Another characteristic of endothelial cells that is very important for regenerative medicine is that they are capable of modulating the level of tissue fibrosis. In the article, “Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis” (*Nature*, 2014), the Rafii team demonstrated that these cells are able to regenerate the liver without fibrosis and that they can decide between cell regeneration with or without fibrosis. “I can guarantee you that endothelial cells can be designed that are less prone to fibrosis and are more regenerative”, said the scientist.

No response to stress

Another experiment that was done in his laboratory was transplanting lung endothelium into the lungs of mice and thereby achieving lung regeneration; however, if liver endothelium was transplanted in the same model, it was found that it did not fit or regenerate. This demonstrates, according to Rafii, that if this technique is desired for clinical practice, it has to be made with endothelial cells specific to each organ.

Because endothelial cells are common in all organs, it is possible to design genetically engineered endothelium specific to each organ, transplant it intravenously and choose the correct “zip code” for it to produce the correct angiocrine factors and cause organ regeneration. However, to do this, it is necessary to define transcription factors that would allow this process and generate generic epithelium in which these transcription factors are placed; this method would first have to be tested in mouse and monkey models. “Our efforts have resulted in an unstable endothelium, but it is 10 times more stable than that achieved with direct reprogramming”, said Rafii.

The question that has defied developmental biology for decades is how the specific endothelium of each organ manages to be unique. Is it because there are transcription factors that make generic endothelium

“Any type of endothelium from various organs can be grown without contamination with lymphatic endothelium.”

unique? There is no doubt that there are biomechanical forces that prevent elasticity.

Based on this fact, Rafii’s team developed the hypothesis that there are distinct activities that provide specific vascularity to each organ. To study this precisely, generic endothelium must be produced. It is something that has been attempted initially through iPS. The experiment was successful because these new endothelial cells grew in cell cultures, scientists were able to expand them and they resulted in a tissue very similar to endothelium. However, the cells were not able to reach maturity, especially if they faced any type of stress from endotoxins, such as hypoxia.

“The last two years we have made endothelial clones from cells derived from iPS cells. After analysing them, we determined that they have the full signature of the endothelium. However, if we placed monocytes on top of these iPS-derived endothelial cells, they resembled original epithelial cells; upon threatening them with hypoxia, they became another type of cell and also acquired many other traits”, reflected Rafii, adding that this same effect has been demonstrated with many other tissues, including haematopoietic and cardiac tissues, and the same phenomenon has been observed. “Undoubtedly, it is one of the fundamental problems we have to solve”, he said.

Amniotic cells

In this sense, scientists have developed an alternative approach. The hypothesis is that an amniotic cell may have gone through this epigenetic process. In a stu-



“Endothelial cells produce growth factors that cause regeneration of organs.”

dy published in *Cell* in 2012, researchers led by Rafii converted mature amniotic cells into endothelial cells through the use of transcription factors and suppression of TGF-beta.

With this system, they were able to obtain a very stable endothelium that under stress, does not lose its vascular stability. They performed this procedure with different types of reprogrammed cells, including iPS and amniotic cells, and found that those derived from iPS cells react worse; they become nonvascular cells. With the new procedure, the generation of functional haematopoietic cells has been attempted, and significant progress has been made.

The next phase of work consisted in reprogramming endothelial cells to precursors of haematopoietic cells, which are made by inducing a vascular niche and, thus, a scalable repopulation of reprogrammed endothelial cells was achieved.

“The most important thing about this work is that we found that the vascular niche makes executive decisions on induction and sustainability of haematopoiesis”, Rafii said.

The Iranian-born researcher concluded his lecture with a reflection on iPS cells, which he defined as “very useful for understanding vascular biology”. However, he warned that many challenges remain. Adult iPS cells can have 70% mitochondrial DNA mutations, and much remains unknown about how the transition from pluripotency to direct conversion is achieved. Reversion to the pluripotent state can sometimes lead to oncogenesis and delete the genetic fingerprint, and

it is a process about which there are still many open questions.

However, direct reprogramming also presents many problems, as it can be inefficient and incomplete. Further, there is evidence that shows that much of the original memory of fibroblasts is not completely eliminated because there is no factor that guarantees such removal.

For this reason, Rafii said that a solution may be reprogrammed amniotic cells at an intermediate stage of gestation. This would, in a sense, be starting from scratch, but the researcher believes it is something necessary to try to solve the genetic fingerprint problem. “If we can find the original source of the conversion of these cells or their precursors, we could apply it to direct conversion”, he said.

The question that arises from this hypothesis is why amniotic cells have such a singular chromatin state (DNA molecules are expanded, in the form of filaments, occupying the entire nucleus). As Rafii commented, in the pluripotent state, it will take a lot of effort to follow each line of each specific gene. Furthermore, chromatin is too rigid in adults; many chromatin structures are condensed and are difficult to disentangle.

The missing key

However, the researcher believes that if science focused on the study of foetal cells in the middle stage of gestation, this pluripotent state will pass on to an intermediate state; the cells are at a midway point, which may be the missing key in cell reprogramming.

Finally, Rafii warned that although much progress is being made in the field of iPS cells, we should not forget about adult stem cells. “We all have stem cells, there are signals that can help them regenerate, and we have to capture those signals and develop models and systems that allow us to apply them”, he said. According to this scientist, the transition to the pluripotent



state disables the cells in terms of their response to physiological stress, and so far, it has not been possible to develop a very stable endothelial line.

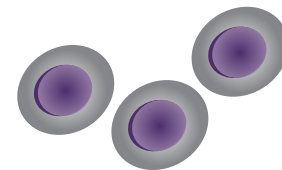
This changes with the results from their experiments because he expressed that amniotic cells reprogrammed into mature, functional vascular endothelial cells (RAC-VEC) are very stable and robust and guarantee epigenetic stability. However, it remains an open question as to how to develop or obtain amniotic autologous cells. Although it has been demonstrated that to reprogram them, different transcription factors such as ETV2 or ERG1 can be used, the problem remains how to obtain these amniotic cells.

The answer proposed by Rafii is to use samples from the more than a million amniocenteses that are performed worldwide each year. The scientist justifies

“The secret of foetal development is in the biology of amniotic cells.”

this proposal in that the more biology is known about these amniotic cells, the more will be known about foetal development, which he defined as a “black box species of the organism”.

Currently, almost all epigenetic aspects of amniotic development are unknown, and Rafii states that when more is known about this matter, scientists will be able to develop specific endothelium from each organ that will be able to help in the regeneration of the desired tissue.



Using direct reprogramming for neuronal repair

Sergio Gascón

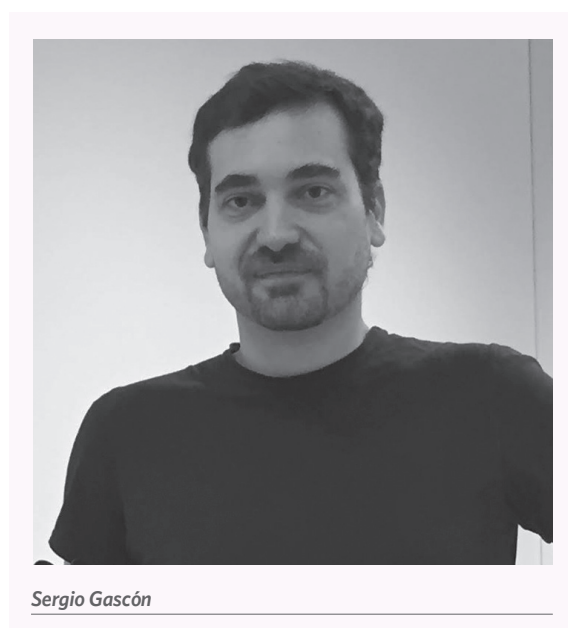
Researcher at the “Ludwig-Maximilians” University of Munich and the Institute for Stem Cell Research at the Helmholtz Centre, Munich, Germany

Unlike in other species, the mammalian brain does not have the ability to repair itself. The principal reason is that this organ lacks progenitors capable of regenerating lost neurons after a cerebral injury. As Dr. Sergio Gascón noted, progenitors are only found in two very specific areas of the brain: the lateral ventricle and hippocampus. However, their small numbers make using these cells clinically unfeasible.

Faced with this problem, and given the social impact of diseases related to the nervous system, there are high hopes for the reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells (iPS) and their conversion into neurons by different methods.

One possible clinical application of this methodology would consist of extracting skin fibroblasts from a patient, cultivating them in the laboratory, and reprogramming the cells into pluripotent cells. Subsequently, these induced stem cells would be differentiated into neuronal precursors that could be transplanted into the injured area of the brain where required.

However, the risks associated with undifferentiated stem cell transplantation in human patients are too high to justify the limited clinical impact that has been observed in studies. Examples of these problems are tumour formation induced by iPS cells and the low efficiency of neuronal conversion obtained in actual clinical cases. Although these technical barriers have thus far made the clinical application of this technology enormously difficult, recent discoveries have brought new hope for



Sergio Gascón

the treatment of neuronal diseases based on cellular reprogramming. This new idea involves the conversion of one cell type into another distinct type without requiring the acquisition of an intermediate phase of pluripotency. This process is known as “direct lineage conversion” or “direct reprogramming”.

Advantages of direct reprogramming

As noted by Gascón, among the different approaches to neuronal regeneration, direct reprogramming appears to have some significant advantages. In principle, there is no need to remove cells from other tissues; instead,



“The transplantation of undifferentiated stem cells can induce tumour formation.”

surviving cells already in the injured area of the brain (primarily glial cells) could be used. These cells could be established as target cells for the insertion of the genes necessary to reprogram them into neurons, thus inducing the regeneration of cerebral tissue from within.

“The greatest advantage of direct reprogramming is that there is no need to go through the conversion to iPS cells” Gascón commented. This process would be shorter, more straightforward, and efficient. In addition, direct reprogramming avoids the most serious inherent risk of iPS cells, which can be oncogenic and thus cause cancer due to their status as highly proliferative and undifferentiated cells. Once one establishes the theoretical advantages of direct reprogramming over the use of iPS cells in neuronal regeneration, one must still answer the key question of whether it is feasible to transform glial cells residing in the brain into neurons.

Gascón stressed that it is a proven fact that iPS cells can be differentiated into neurons in the laboratory. It is also known that these cells can be transplanted in vivo and lead to neurons able to survive for long periods of time in the mouse brain. “The literature has shown that this is possible in animal models, but their clinical application in humans is not yet proven”, commented the researcher, who added that the new cells transplanted into the brains of mice survive, are integrated into the cerebral network, and may reduce the symptomatology of specific models of brain injury.

Moreover, direct reprogramming has also been shown to be possible. Gascón has performed this process in the laboratory of Magdalena Götz, at the University of Munich. “First, we did it in vitro with astrocytes, one of the most numerous glial cells in the brain.”

What the researchers did was to culture these astrocytes in vitro and infect them with retroviruses that introduce specific genes into the cells they infect, thus forcing the infected cells to become functional neurons capable of establishing synapses and transmitting nerve impulses.

Later, other groups showed that the same feat could also be accomplished with fibroblasts obtained from human skin samples isolated from patients.

Improving efficiency

Once it had been demonstrated that these experiments could be performed in vitro, an unanswered question remained: could the same process be repeated in vivo? “What we and other scientific teams have demonstrated is that it is a feasible hypothesis. Glial cells can be reprogrammed in vivo, and the resulting neurons grow, survive, develop synapses, and connect with other neurons residing in the brain”, explained Gascón, who nonetheless believes that a key question remains to be answered — whether these cells may be used in the future to reduce the symptomatology of specific cerebral pathologies in humans.

“In our first experiments, we observed that the reprogramming efficiency was very low and the neurons exhibited a very immature phenotype, which provided limited benefit.”

For this reason, much of the work in tissue regeneration consists of studying methods for improving reprogramming efficiency. “In the ideal situation, the same number of neurons would be ultimately obtained from a specific number of fibroblasts, but this usually did not

“The iPS cells can be differentiated and transplanted, resulting in neurons capable of surviving in the brain.”



occur; the conversion efficiency was initially very low”, Gascón commented.

In theory, this outcome could be improved by combining the expression of many genes in the same cell; the more genes that are used, the more efficient the conversion. However, with the available techniques, it is difficult to simultaneously introduce more than two genes into the same cell. Of course, numbers of genes on the order of dozens would be unthinkable, at least in vivo. Thus, the science is now focused on understanding the barriers to improving reprogramming efficiency without increasing the number of genes necessary to activate the process.

Avoiding cellular stress

To study these barriers, Gascón’s team designed an experiment consisting of video-tracking with time intervals. It involved using a microscope to videotape the conversion and observing how astrocytes were converted into neurons in vitro, but separately analysing each frame. What they observed was that the astrocytes were indeed capable of becoming neurons; however, the majority of the cells died during the process. “We observed that cellular death was very significant and greatly limited the efficiency of reprogramming”, Gascón explained.

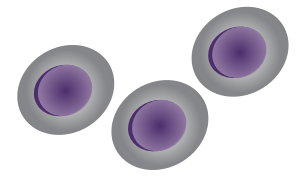
This initial discovery provided the key to improving the efficiency of the process. “We have confirmed that during reprogramming, the cells are subjected to different types of cellular stress. This blocks conversion while killing the majority of the cells. With the application of specific genes and drugs that reduce specific types of cellular stress, the reprogramming efficiency

“We can induce the conversion of glial cells into neurons in vivo with an efficiency of 90%.”

increases considerably. We are now capable of inducing the conversion of glial cells into neurons in vivo with an efficiency of 90%, compared with the 3–30% efficiency previously attained. These neurons also appear much more mature, which gives us new hope for their future clinical application”.

However, many barriers remain to be overcome. For example, Gascón highlighted the need to focus on the specific neuronal subtypes that can be obtained from glial cells. “In a pathology like Parkinson’s, we would need dopaminergic neurons; other cell types would be irrelevant. In addition, we must ensure that the integration into the neural network is correct. The projections of the new neurons have to be directed to specific areas of the brain and cannot be distributed randomly”, he noted, again emphasising that widespread use in humans “is far from being seen in the near future”.

Although we still cannot directly apply these discoveries to the treatment of particular diseases of the brain, they represent great scientific advances. For example, we can now easily work with human neurons in the laboratory and research models of neural diseases both in vitro and in vivo, which was unthinkable a few years ago. A better understanding of the mechanisms that underlie the pathologies of the nervous system will accelerate the development of new drugs that will help us treat specific diseases.



Skeletal stem cells and their mesenchymal doubles

Paolo Bianco

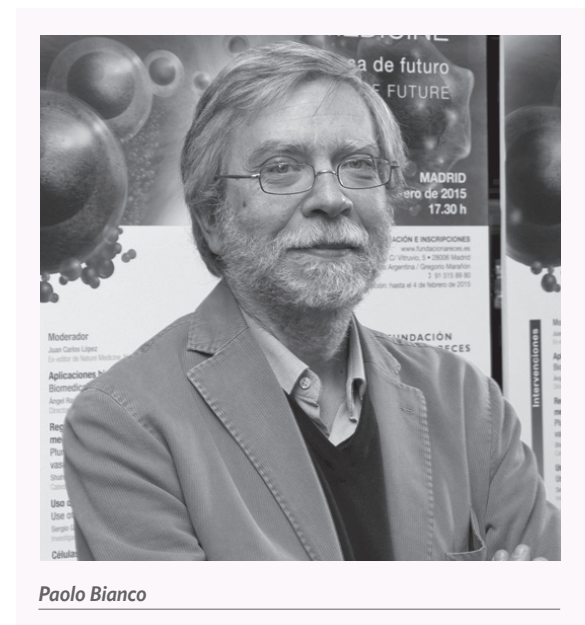
Pathologist and Professor of Pathology at Department of Experimental Medicine, University of Rome “La Sapienza,” Italy

In a single bone structure, such as the tail of a mouse, which is comparable to a human bone, there are two types of stem cells: haematopoietic and mesenchymal. As Paolo Bianco explains, this was a revolutionary concept approximately 40 years ago, and since then, more than 27,000 articles have been published on these skeletal stem cells and their mesenchymal doubles.

The concept was revolutionary because it entailed two curious facts: first, that the common putative progenitor of different tissues was in bone marrow, which was known to be the place of production of haematopoietic stem cells. Second, this location overlapped distinguished marrow as the only organ in the body that was equipped with two different stem cell types that fed two different types of tissues or organs.

“Now we know that the biology of skeletal cells is based on a simple seminal experiment: extract bone marrow without bone or a bone marrow cell suspension and transplant it to a heterotrophic place in a small mammal”, explained Prof. Bianco. He added that this experiment was conducted not to determine if there were stem cells in bone marrow but rather with the objective of determining if haematopoiesis could be transplanted to a location that had no bone.

The response to this hypothesis was ambiguous at the time, and it took over 40 years to find out that the osteogenic factor in bone marrow was a non-haematopoietic cell. Furthermore, it was observed that



Paolo Bianco

a property of these skeletal stem cells is the ability to institute dense growth in vitro; in other words, they were clonogenic and could be considered progenitor stem cells. However, it was also found that the ability to form ossicles in a mouse could be traced to the progeny of a single clonogenic cell, implying that the progeny of a single cell can differentiate into bone cartilage or fat.

“There is more than one tissue type in the skeleton, which shows the existence of a pluripotent progenitor in bone cell”, said Bianco, who explained that his team had already demonstrated this thesis both in human cells in vivo as well as in mice.



“There is more than one tissue type in the skeleton, which shows the existence of a pluripotent progenitor in bone cell.”

Renewability

As a result of their work, it is now known that there is a stem cell that is capable of self-renewing and generating multiple skeletal tissues in the stroma of humans and mice. These cells reside outside the sinusoids, the only blood vessels in bone marrow, and as observed in their histology, they can be isolated prospectively and generate cultures.

Professor Bianco said it is easy to show that mesenchymal cells double as skeletal cells because when observing them under the microscope, they reveal a structure that is a direct replica of mouse or human bone, according to the example used. Within its architecture, cortical bone, blood vessels, a cavity and haematopoietic cells filling the cavity can be observed; it can be demonstrated that the bone is human in origin or consists of endothelial cells that are forming bone cells in marrow.

Mesenchymal cells that are transplanted are perfectly “aware” of their unique properties. “These cells are unique in the natural world. In fact, if we call them stem cells, it is because they are capable of organizing tissues and self-renewing in any bone while following the right architecture”, noted Prof. Bianco. He stressed that this capability is why such a high degree of “architectural perfection” is achieved.

Two cell types

In a mouse experiment, it was observed that following transplant, in the medullary cavity, two cell types coexist that reside around blood vessels: skeletal cells, which have been shown to have all the properties by phenotype and in fact can be recultivated and retransplanted,

and haematopoietic stem cells of the host mouse. Because no scaffolding was used in this system, it was easy to evaluate the extent of this phenomenon and demonstrate with a simple calculation that the tissue volume is equal to the volume of a single transplant; there were hundreds of times more haematopoietic cells than in an equal volume of peripheral blood of the host mouse.

What this experiment is, in fact, is a reverse bone marrow transplant because no haematopoietic progenitors were transplanted in the system. Despite this, it does create an additional dose of haematopoietic bone marrow through local colonization of circulating haematopoietic stem cells in the created organ.

Thus, a niche of such stem cells is created. The concept is based on the fundamental idea that stem cells are in their own niche and that with this system, stem cells colonize the organoid. They are not localized in the bone marrow niche of mice but rather circulate in the peripheral blood and are sufficient to repopulate the entire system.

The experiment aims to solve one of the most difficult questions raised by tissue engineering over the past 15 years: what is the best structure to use with progenitors if we are to rebuild a piece of bone? The answer is that the best scaffolding is to use none and that the basis of success is that they can do it themselves because they are induced to become a small part of cartilage before transplantation to the mouse. This is not only a technical advantage but can also be scaled in tissue engineering because it indicates that part of the functions we ascribe to the scaffold can be mimicked by the cells.

“Mesenchymal cells are able to organize tissues, achieving architectural perfection.”



Fibrous dysplasia

Professor Bianco also addressed the issue of fibrous dysplasia. In his studies regarding the origin of this disease, the Italian team noted that it is a disease that cannot be cured with stem cells because it affects these same cells. It is a monogenic disease caused by the mutation of a gene, which is the result of a methylation sequence that can only occur during a particular moment in development and can only happen prior to vascularization.

This is known because the phenotype of the disease in humans involves diseases of organs from the three different germ layers and is clear proof that the mutated clone is derived from a pluripotent cells; because of the type of mutation, it cannot begin until the embryo is at the eight-cell stage. The disease is devastating to the skeleton, disfigures the patient, and causes bone to become soft, to bend, to deform and be brittle. The patient becomes confined to a wheelchair, and it also causes sensory deficits, such as loss of vision. It is an incurable disease.

Prof. Bianco and his colleagues have worked in pursuit of a cure of this disease. The studied hypothesis was that similar to how stem cells can be transplanted to a mouse and generate new bone, it should be possible to 'make' a replica of the bad bone in vivo in a mouse with the disease caused by the mutated gene.

Having conducted this experiment, it was found that it could be used to identify therapeutic targets against the disease. It was observed that in this bone, endocrine cells produced the FGF23 hormone, which acts on the kidney, decreasing phosphate and causing rickets and osteomalacia. These symptoms affect a subset of patients, those with the highest burden of disease.

Gene correction

Italian researchers are using ex vivo stem cells to correct the gene defect that causes this disease, which is not easy. As Bianco summed it up, "It is not simply about

"Fibrous dysplasia is a developmental disease that affects stem cells."

finding a missing gene; it is a mutation of a function of a gene expressed ubiquitously, and the objective is to correct a monogenic systemic disease in the human skeleton".

To end this disease, one would have to devise a way by which the gene defect can be corrected and do so in stem cells ex vivo. The strategy is to specifically eliminate the bad allele in the diseased progenitor without damaging its function.

Bianco's team managed to reverse the fundamental phenotype in skeletal stem cells ex vivo. But this is not enough. It must be ensured that mesenchymal stem cells will systematically find the target lesion naturally. "At that moment, we will have cured the disease", said the researcher.

However, this has not yet been achieved because these cells cannot be injected systematically because unlike stem cells, they do not integrate into the circulation and many are eliminated. Thus, it appears that this type of stem cell is good for making a miniature model of disease but not for treating it.

Bianco has been able to create mouse models so attuned that when showing the images to an orthopaedic surgeon, he diagnosed fibrous dysplasia. However, this disease was only reproduced well if the diseased gene is expressed under the control of a constitutive promoter. "It accomplishes this but only through a time sequence that spans the entire life of the mouse", explained Bianco.

In another similar experiment, it was shown that if the diseased gene is injected into pluripotent cells and these cells are used to create a teratoma or form



“In the mouse model of the disease, fat cells are what make the bones.”

cartilage, both in vitro and in vivo, completely normal bone and cartilage formation is observed.

“It took us five years to discover this simple fact. All the mice that had to develop fibrodysplasia in the skeleton would first show changes in the tail, and then, the disease progressed along the skeleton”, said Bianco, who came to this conclusion after analysing serial radiographs from more than 200 mice.

The key lies in fat

The fundamental reason for this effect is that the tail of the mouse is a place in which the bone marrow is filled with fat cells at a very early time after birth, a phenomenon that does not occur in the rest of the skeleton. Thus, the disease develops from changes that occur in marrow. “This does not occur if we place the mutation under control of a promoter specific to osteoblasts. In that case, we end up with a phenotype that, in fact, is not even a disease but is a phenotype of high bone mass that does not even resemble the disease caused by the

mutation in humans”, Bianco clarified. He added that the gene does not cause disease through an effect on pluripotent embryonic progenitor cells or through mature cells that form bone and that they are progeny of postnatal skeletal stem cells.

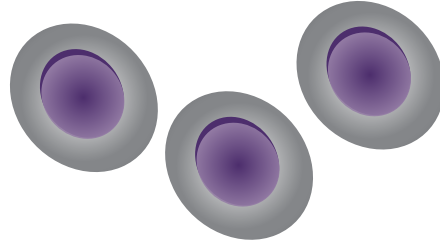
The researchers concluded that in this disease model, fat cells are those that produce bone. “It may seem surprising, but it is not, because the effect of the mutation on fat cells makes them brown adipose tissue”, said Bianco. He also noted that there are a variety of inferior osteoblasts that functioned more poorly and are recognized because they express a gene that is normally not expressed by bone-forming cells: MGP, the most potent inhibitor of bone mineralization. “When expressed in osteoblasts, soft non-mineralized bone is generated, which is precisely what happens in this disease”, summarized the Italian researcher.

The expert concluded his lecture by saying that the expression of this gene in these cells is just “one of the two key players of the disease”, along with the TNCR gene. These findings imply that these “molecular players” can become direct targets for testing drugs against the disease. The good news is that in addition, some of these drugs already exist, which will facilitate studies in humans, although time is still needed for this line of research to progress.

discussion

Moderator:
Juan Carlos López

Round table:
Ángel Raya, Shahin Rafii, Sergio Gascón and Paolo Bianco



Discussion

Juan Carlos López: Having listened to all the presentations, I have the impression that many questions remain to be discovered. What do you believe the challenge to be that once it is solved, will advance even more spectacular research in regenerative medicine? What would be the turning point in this field?

Shahin Rafii: There is still much to learn about the biology of stem cells, but I believe that finding out more about haematopoietic cells will be crucial. In any case, one cannot speak of a single key factor but rather a combination. There are many unresolved questions of basic science.

Sergio Gascón: The key is whether the stem cell we obtain after differentiation can be considered a normal cell and to what extent they are going to affect epigenetic aspects. In short, we need to be able to ensure that the cell with which we intend to repair a tissue behaves as it should.

Paolo Bianco: I do not think the large knowledge gap is in knowing



Shahin Rafii, Sergio Gascón, Juan Carlos López, Paolo Bianco and Ángel Raya.

more about cell biology. Our great challenge, at least if we want to keep the name of regenerative medicine in this field, is precisely to include some medicine. We must learn how to fit what we already know of the diseases that we want to cure with stem cells with the knowledge we have on stem cells themselves. Can we use stem cells as bricks to rebuild tissue? Maybe we need a completely different approach and can use them to determine which drugs to use or what targets should

be addressed by these medications? This is an even more urgent question to answer.

Ángel Raya: We should stop calling any cell a stem cell and stop confusing regenerative medicine with cell therapy. For me, the challenge is to better understand differentiation of pluripotent stem cells, and for this, we must stop focusing on embryonic development because development does not end after birth and we do not know much about postnatal changes. When



we understand this differentiation process and reproduce it beyond on the addition of growth factors is when we will be able to use it in clinical practice.

In the Virgen del Rocío Hospital, regeneration of infarcted hearts is proceeding with stem cells. Are coronary cells easier to regenerate than other cell types in the human body?

Ángel Raya: Currently, patients with acute myocardial infarction are being injected with haematopoietic progenitor cells, the so-called mesenchymal stem cells. These cells have been used in many clinical trials and what has been seen is that they do not regenerate myocardium, and they do not produce new muscle cells. However, the infarct is accompanied by tissue inflammation, and these cells are capable of secreting factors that modulate inflammation so that the infarct is smaller and there are less dying cells. It is something that also happens in the brain, but in this case, rather than speaking of regenerative medicine, we would have to speak of cardioprotective medicine. As to whether cardiac muscle cells are easier to regenerate than others, the answer is no, quite the contrary.

Has the role of food as a control factor for oxidative stress been studied?

Sergio Gascón: We do not know why oxidative stress occurs in our programming models; it is a question that remains to be solved. Although we know that many diseases are caused by oxidative stress, it is still not known how to resolve it, although diet is important, and with a good diet, oxidative stress is reduced; to date, these are the only methods that really works so far. There are some specific treatments for Parkinson's that attempt to reduce oxidative stress, and an effect has been seen. However, reducing this factor in a whole organism is not easy because it is associated with the mitochondria and metabolism and is a complex issue.

What problems can there be in the trial that is being conducted by injecting pluripotent stem cells in the retina?

Shahin Rafii: I am concerned because iPS cells obtained in the laboratory are not mobile in that environment, as they are still immature, and there is the possibility that the immune system of the eye will not recognize them. The problem would be if derived cells were mobile once injected into the retina

and passed through the optic nerve to the brain and lodged there. If this happens, it would be a setback. I think it is going very fast, and I hope there is safety, but I think we still do not know how to manage cells that due to their condition, will want to keep proliferating.

Can you explain more about the first clinical trial being conducted in Japan?

Ángel Raya: The trial consists of generating iPS cells from six macular degeneration patients to be recruited. These iPS cells will be differentiated into pigment epithelial cells and will be injected into the retina. It should be clarified that this is a phase I clinical trial that is intended to demonstrate the safety of the procedure. Normally, these types of trials are performed in healthy subjects, but it has so much added risk that people whose vision cannot get worse have been selected. If the safety of the procedure is demonstrated, pigment epithelial cells could be injected into the retina with beneficial effects if they produce support for the remaining healthy photoreceptors.

One risk of using induced pluripotent cells is that cell proliferation can cause tumours. However, there are also very unspecific tumours, such as triple negative



Ramón Areces Foundation held the seventh conference of this cycle.

breast cancer, and I wonder if somehow this process we observe in the disease can be used for other reprogramming.

Ángel Raya: Any pluripotent cell has a risk of tumourigenesis due to its proliferative ability, both in vitro and in vivo. Faced with the apocalyptic messages that have been transmitted, it is important to remember that there are strategies to avoid this, and above all, nobody is going to inject any cellular product into patients if there is the least risk that it can form a tumour.

Juan Carlos López: *To conclude, what is your final message?*

Ángel Raya: Regenerative medicine is in a research phase, but it is moving very fast to clinical appli-

cations. Concerning iPS specifically, I am aware that there are problems to be treated, and the main one is precisely how to differentiate these cells. However, the fact that they have the potential to differentiate is an opportunity.

Paolo Bianco: Rome was not built in a day. I would like to convey to society that it is important not to rush because if we do, things can go wrong. Expectations come from reasoned science. It took 70 years to understand that haematopoietic stem cells are made in bone marrow, and 50,000 people are saved per year as a result. It takes patience.

Sergio Gascón: It must be understood that when we speak of clinical application, everyone thinks cure, but one must first understand it is

a slow process. Stem cells and reprogramming will produce many benefits in the future, but bear in mind that just a few years ago we were unable to have neurons in a petri dish. Now we have the cells, and we can research them in vitro. We will not immediately find cures, but we are moving in the right direction, and we are learning.

Shahin Rafii: The potential of adult stem cells should not be forgotten. One must understand the biology of these stem cells, how they interact, and how they renew and not only study the role of these stem cells in the developing foetus. The more we focus on basic biology, the more success we will have to translate this knowledge into clinical practice.

Medicina regenerativa

PROMESA DE FUTURO

La curación de enfermedades sin tratamiento, la regeneración de tejidos dañados por la vejez o por un traumatismo, la creación de órganos listos para trasplante o la solución a trastornos genéticos son algunos de los objetivos de la medicina regenerativa, una de las armas médicas del futuro y un campo de estudio real en el presente, a partir de la aplicación de las células madre.

En la actualidad, los científicos han probado la plasticidad de las células madre embrionarias, que son capaces de convertirse en otros linajes como neuronas, cardiomiocitos, osteocitos, etc. De hecho, estas mismas células han sido capaces de generar miniórganos como el hígado, cerebro y riñón. Toda una promesa para poder, en un futuro, conseguir órganos para trasplantes o injertos para reparar partes dañadas de un tejido, o también para probar fármacos específicos para enfermedades propias de esos órganos.

REGENERATIVE MEDICINE

Promise of future

The healing of diseases without treatment, the regeneration of tissues damaged through old age or trauma, the creation of organs ready for transplantation or to solve genetic disorders are but some of the objectives of regenerative medicine, one of the medical weapons of the future and a real field of study at present, based on the application of stem cells.

Scientists have already demonstrated the plasticity of embryo stem cells, which are capable of turning into other lineages, such as neurons, cardiomyocytes, bone, etc. In fact, these same cells have been able to generate mini-organs such as the liver, brain and kidney. A veritable promise for, in the future, being able to achieve organs for transplantations or grafts to repair the damaged parts of a tissue, or test specific drugs for the typical diseases of these organs.

