



Achievements and struggles in stem-cell investigation research

Title in Spanish: *Logros y conflictos en la investigación con células troncales*

M.^a del Carmen Avendaño López^{1,*}

¹Catedrática de Química Orgánica y Académica de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia.

ABSTRACT: This report describes events, circumstances and conflicts that have surrounded to several researchers protagonists of the advances on the stem cells knowledge along a hundred of years, from the cell immortality dogma to the discovery of tecnicis to produce them to be used in regenerative medicine. At this respect, a brief analysis of the expected outlook for induced human pluripotent cells (iPS) is included and compared with nuclear transfer human stem cells (NT-ESC) and production of human embryos by somatic cell nuclear transfer (SCNT embryos).

RESUMEN: Se relatan circunstancias, peripecias y conflictos que han rodeado a varios de los investigadores que han protagonizado el avance de los conocimientos sobre las células troncales a lo largo de cien años, desde el establecimiento del dogma de la inmortalidad celular hasta las técnicas desarrolladas para obtenerlas y utilizarlas en medicina regeneradora. En este último aspecto, se incluye un breve análisis de las perspectivas previstas para las células pluripotentes inducidas (iPS) en relación con las células troncales producidas por transferencia nuclear (NT-ESC) y la producción de embriones humanos por transferencia nuclear de células somáticas (embriones SCNT).

* **Corresponding Author:** avendano@ucm.es

Received: June 20, 2017 **Accepted:** October 18, 2017

An Real Acad Farm Vol. 83, Nº 3 (2017), pp. 321-331

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

La **Medicina Reparadora** es una nueva y prometedora estrategia terapéutica basada principalmente en la manipulación de las **células madre o troncales** (*stem cells*). Aunque todavía hay muchas lagunas para explicar su conducta y dar sentido a algunos de los fenómenos “misteriosos” que se observan con estas células, su estudio ha conseguido logros relevantes que están permitiendo entender el desarrollo embrionario temprano y la formación de los órganos, abriendo el camino a su aplicación clínica. Además de estos logros, premiados con frecuencia con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina, estas investigaciones han originado en algunos casos rivalidades, intrigas y fraudes (1).

Aunque la información y la literatura publicada en este campo resulta abrumadora, nos hemos atrevido a hacer una selección para relatar cronológicamente cómo se han ido desarrollando los conocimientos, pero también cuales han sido las circunstancias y peripecias que rodearon a los hombres y mujeres que protagonizaron algunos avances extraordinarios y las que afectaron a los implicados en sus conflictos. Obviamente, los biólogos conocerán sobradamente estos hechos, pero nosotros creemos que esta perspectiva puede interesar a los que no lo son, acercándonos así a la formación humanística que deben tener los científicos (2).

2. EL DOGMA DE LA INMORTALIDAD CELULAR. HISTORIAS RELACIONADAS CON LAS CÉLULAS WI-38

En las ciencias biomédicas se han producido desviaciones del método científico que hoy pueden parecernos increíbles (3). Un ejemplo paradigmático es el dogma de la **inmortalidad celular**, una creencia que fue aceptada por la comunidad científica durante unos 60 años aunque estuvo basada en un único experimento que no pudo reproducirse nunca. Su autor fue **Alexis Carrel** (Figura 1), una de las figuras más controvertidas de su generación por ser partidario de la eugenesia, que fue premiado con el **Nobel de Fisiología o Medicina en 1912** por sus importantes aportaciones al desarrollo de la medicina y la cirugía, especialmente las relacionadas con las anastomosis vasculares, el cultivo de tejidos y el trasplante de órganos, donde la unión de vasos sanguíneos es indispensable para restablecer la circulación (4). Para mantener vivos los órganos fuera del cuerpo humano, también desarrolló una bomba de perfusión extracorpórea en colaboración con el aviador e ingeniero estadounidense Charles Lindbergh.

En enero de 1912, trabajando en la Universidad Rockefeller de Nueva York, Carrel extrajo el embrión de pollo de un huevo y cortó un pequeño fragmento de su corazón con el fin de mantenerlo vivo el mayor tiempo posible. Al poco tiempo anunció que su cultivo era inmortal y que la inmortalidad era inherente a todas las

células (5). Éstas podrían replicarse indefinidamente en un medio de cultivo adecuado, ya que la muerte era la consecuencia de cómo se organizaban en el cuerpo. Aunque las células se morían en todos los laboratorios que quisieron repetir el experimento, dado el enorme prestigio de Carrel, fueron muy pocos los que pusieron en duda su descubrimiento, y la mayoría asumió que el fallo de sus experiencias se debía a alguna contaminación o al empleo de un medio nutritivo inadecuado. Carrel y sus colaboradores aseguraron más tarde que su cultivo se había mantenido vivo durante 34 años, y hubo que esperar a que **Leonard Hayflic** (Figura 1) descubriera en **1962** que solo las células cancerosas son inmortales y que las células somáticas normales (humanas y de animales) tienen una capacidad limitada para replicarse antes de entrar en senescencia.

La historia de este hallazgo comienza por el interés de Hayflick en detectar si los virus causaban cáncer. Para ello necesitaba células humanas normales que pudieran cultivarse en el laboratorio pero, como no le servían las células adultas porque habrían estado expuestas a distintos virus, recurrió a las **células fetales**. En el Instituto Wistar de Filadelfia, donde trabajaba, creó varias cepas de células a partir de un feto procedente de un aborto. En esa época, los abortos eran ilegales en Pensilvania, pero los doctores los realizaban si consideraban que existía una necesidad médica, y Hayflick pensaba que si no utilizaba esos tejidos para sus investigaciones acabarían siendo incinerados. De esta forma desarrolló 25 cepas de células fetales diferentes, que numeró de WI-1 a WI-25. Al cabo de unos meses se extrañó de que las cepas celulares más antiguas empezaran a replicarse más lentamente, incumpliendo la ortodoxia establecida: “las células *in vitro* tratadas adecuadamente se podrían replicar hasta el infinito”.

Todas las cepas sufrieron el mismo proceso y, aunque las células seguían siendo activas metabólicamente, la división terminó después de 50 duplicaciones sin que intervinieran factores extrínsecos. Estos resultados se publicaron en 1961 en la revista *Experimental Cell Research* (6), tras haber sido rechazados por *The Journal of Experimental Medicine* en una carta enviada por **Francis Peyton Rous**, el tercer personaje de esta historia (Figura 1). Los argumentos de esta carta se basaban en el **dogma establecido por Carrel**: “*Anyone who has worked with tissue culture knows that if the cells are provided with the proper milieu in vitro they will replicate indefinitely*”.

Peyton Rous, que había dado nombre al sarcoma de Rous, fue uno de los descubridores del papel de los virus en la transmisión de ciertos tipos de cáncer, por lo que recibió junto a **Charles Brenton Huggins** el **Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 1966**. Sus trabajos se completaron por **J. M. Bishop** y **H. E. Varmus** en 1976, al comprobar que los genes responsables de la transformación de las células normales en malignas no eran de origen vírico, sino que estaban presentes en los genomas humanos aunque en un estado no oncogénico, por lo que se les denominó **proto-**

oncogenes. En **1989** se otorgó a ambos el **Premio Nobel de Fisiología o Medicina**.



Figura 1. Alexis Carrel, Leonard Hayflick y Francis Peyton Rous.

Hayflick descubrió posteriormente que **las células del cáncer son inmortales** y que **las células fetales humanas tienen memoria**, de forma que si se congelan después de un número determinado de duplicaciones, cuando se descongelan recuerdan las que habían experimentado previamente, y se duplican hasta un total de 50 divisiones. Estos trabajos se criticaron y ridiculizaron, y solo después de 10 años se aceptó que las células tienen un tiempo de vida limitada *in vitro*, conocido como **límite de Hayflick** (7). Hoy sabemos que este tiempo depende de la actividad de una transcriptasa inversa llamada **telomerasa**, que produce hebras de ADN utilizando como molde hebras de ARN.

En el organismo, la telomerasa está implicada en el alargamiento de los **telómeros**, estructuras de ADN no codificantes que protegen a los extremos de los cromosomas prolongando el tiempo de vida de las células y aumentando su número de divisiones. Esta enzima actúa fundamentalmente en las células germinales embrionarias, y se encuentra reprimida en las células somáticas diferenciadas con la excepción de las hematopoyéticas y epidérmicas. En condiciones fisiológicas normales, la longitud de los telómeros declina con las sucesivas divisiones celulares, hasta que no son capaces de proteger a los cromosomas. Debido a la inestabilidad cromosómica, las células entran entonces en senescencia y finalmente en apoptosis. Cuando una célula somática se maligniza a través de mutaciones, estas reactivan la producción de telomerasa y cuando se dividen el telómero no se acorta (8). Esta es la razón por la que las células cancerosas son inmortales y por la que los inhibidores de telomerasa se han estudiado para el tratamiento del cáncer (9).

Continuando con nuestro relato sobre Hayflick, en 1962 el Instituto Nacional del Cáncer patrocinó al Instituto Wistar y lo contrató como co-investigador principal “*to produce, characterize, store and study human diploid cell strains and to distribute such cell strains to all qualified investigators*”. Hayflick obtenía en esos momentos tejidos fetales del Director del Departamento de Virología del Instituto Karolinska de Suecia, donde el aborto era legal. De uno de los pulmones que recibió de dicho Instituto, Hayflick y el citogenetista Paul Moorhead obtuvieron la cepa WI-38, cuyas células han ayudado a salvar muchas

vidas al permitir aislar, cultivar y manipular diversos virus para el desarrollo de vacunas, como los poliovirus causantes de la poliomielitis. A la vacuna contra la poliomielitis A le siguieron otras que inmunizaron en los años sesenta y setenta a muchos millones de personas contra rubéola, rabia, paperas, y hepatitis A. La mayoría de las células que se utilizaban experimentalmente en esos años, como las famosas células HeLa, procedían de distintos tipos de cáncer por lo que eran genéticamente anormales. En contraposición, las **células WI-38** eran células humanas “normales” y podían estar disponibles en cantidad, aunque dada su procedencia podían ser éticamente discutidas.

Hayflick donó las células WI-38 a los fabricantes de vacunas, ya que entonces las células vivas no podían patentarse, pero tuvo problemas con los responsables del control de vacunas del Instituto Nacional del Cáncer, precursor de la FDA, que advertían un posible peligro si las células mutaban y se volvían cancerosas. El desarrollo de las células WI-38 se había realizado sin aportaciones económicas gubernamentales o privadas, y el investigador terminó su contrato cuando se trasladó a Stanford en 1968. Su laboratorio continuó allí investigando cómo las células humanas en cultivo mantenían la memoria del número de divisiones que habían realizado y en 1975 demostró, junto con el estudiante **Woodring E. Wright**, que este contador celular se localiza en el núcleo. Puede decirse que Hayflick comenzó los estudios acerca de **cómo envejecen las células** (10), pero también fue el primero en aislar el *Mycoplasma pneumoniae* y demostrar que era un agente causante de la neumonía atípica primaria (11).

En Stanford, la demanda de células WI-38 continuaba, por lo que Hayflick empezó a cobrar para sufragar los transportes, ingresando al parecer las ganancias en una cuenta hasta que se decidiera su destino. En 1976 las instancias oficiales consideraron esta actitud un robo al Gobierno Federal y lanzaron serias alegaciones contra él, llegando a confiscar el material congelado almacenado en sus laboratorios. Hayflick inició un pleito contra el Gobierno de EEUU y, tras seis años de litigio, llegó a un acuerdo por el que le fueron devueltos parte de las células confiscadas y los fondos recibidos por su transporte (al parecer pagó con ellos los gastos del pleito). Personalmente, tuvo la satisfacción de recibir el apoyo de 85 científicos que, en un artículo que publicó la revista *Science* en 1982, objetaron la conducta del NIH y de la FDA (12). Hayflick ha manifestado la creencia de que este enfrentamiento facilitó que los científicos obtuvieran los derechos de propiedad intelectual y que muchos se hayan convertido en emprendedores

3. CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES, CÉLULAS MADRE ESPECÍFICAS DE TEJIDO Y CÉLULAS MADRE TUMORALES. TRANSFERENCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS. TRANSDIFERENCIACIÓN. CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS

Poco después de la fertilización de un óvulo, la agrupación de células que forman el trofoblasto, el embrioblasto y la cavidad blastocelular forman el llamado blastocisto, del que derivará el embrión humano. De él pueden aislarse las **células troncales embrionarias (embryonic stem cells, ES cells)**, también denominadas **células troncales pluripotentes (PSCs)** porque son capaces de producir cualquier tipo de célula de un organismo adulto cuando se dividen. Las **células madre adultas**, que se encuentran en fetos en desarrollo, en niños y en adultos, se conocen con el nombre de **células madre específicas de tejido**, porque son capaces de formar solamente uno o dos tipos de tejido. Actualmente se conocen cerca de 20 tipos de estas células en el individuo adulto, y su misión es regenerar tejidos desgastados, como la piel y la sangre, o dañados como el hígado. Las más conocidas y empleadas en clínica son las **células madre hematopoyéticas de la médula ósea**. En los últimos años se ha identificado un pequeño número de células en distintos tipos de tumores con características de células madre pluripotentes; son autorrenovables y pueden diferenciarse para originar todos los tipos de células que se encuentran en un cáncer particular. Estas **células madre tumorales (cancer stem cells)** son más resistentes a los tratamientos convencionales utilizados en oncología, y se les atribuye la capacidad de originar, expandir y producir las metástasis y las recidivas (13).

Tradicionalmente, se había asumido que los procesos de desarrollo y diferenciación celular eran irreversibles. El biólogo **Conrad Hal Waddington**, en su famoso “*The Waddington’s epigenetic landscape*”, representó gráficamente este concepto en 1957 situando una célula madre en la cima de una colina con mucha pendiente. Al descender, la célula había adquirido una identidad epigenética celular irreversible y no podía volver atrás (14). Este dogma quedó en entredicho cuando el biólogo británico **John Bertrand Gurdon** (Figura 2), al que sus maestros en la escuela consideraron demasiado estúpido para estudiar ciencias, descubrió que al reemplazar el núcleo de una célula del ovocito de una rana por el de una célula del intestino de otra rana madura se desarrollaba un renacuajo normal. Se trataba de la primera clonación de un animal adulto, y significaba que el ADN de la célula madura tiene toda la información necesaria para desarrollar todas las células del animal. Es decir: **aunque las células madre adultas son especializadas, la especialización es reversible** (15). Esta técnica iniciada por Gurdon se denominó **transferencia nuclear de células somáticas (somatic cell nuclear transfer, SCNT)**, y le valió para compartir con **Shinya**

Yamanaka (Figura 2) el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 2012.

La **plasticidad celular** recibió un espaldarazo en 1979, cuando se describió que los fibroblastos tratados con el agente desmetilante del ADN 5-azacitidina (AzaC) se transformaban en mioblastos, precursores de células de músculo esquelético (16). Esta reprogramación, en la que una célula madura se convierte en otro tipo celular también diferenciado, se denomina **transdiferenciación**. **Andrew Lassar** y **Harold Weintraub** pensaron que los mioblastos transdiferenciados anteriormente mencionados debían expresar algún factor específico de células musculares, lo que les llevó al descubrimiento y clonaje del **factor de transcripción Myod**, demostrando que su introducción en fibroblastos inducía su transdiferenciación a células musculares (17). Los factores de transcripción son proteínas que se unen a secuencias específicas de ADN, controlando la transcripción de la información genética del ADN al ARN mensajero.

En 1998, se cultivaron por primera vez las **células madre embrionarias humanas** (18), despertando la esperanza de encontrar **nuevos tratamientos para muchas enfermedades** como el Parkinson, el Alzheimer o la diabetes. Pero, aunque con ellas se han realizado experimentos relevantes, su uso se considera en general éticamente reprobable dado que solo pueden extraerse de embriones humanos. Entre los muchos biólogos que investigaban en esos años si era posible transformar en el laboratorio una célula adulta en una célula pluripotente sin necesidad de producir un embrión clonado, nos encontramos al equipo liderado por **Yamanaka** en la Universidad de Tokio. El año **2006**, más de 40 años después de los descubrimientos de Gurdon, este equipo demostró que es posible dicha transformación, ya que las células del tejido conectivo de ratones podían reconvertirse en células inmaduras capaces de originar distintos tipos de célula tras adicionarles un cóctel de cuatro genes denominado **OSKM**. Estos genes codifican los **factores de transcripción Oct3/4, Sox2, c-Myc, y Klf4** (19), llamados desde entonces **factores de Yamanaka**. En el año **2007**, el mismo equipo demostró que puede reprogramarse de igual forma cualquier célula adulta del cuerpo humano y producir así **células madre pluripotentes inducidas (iPS)** (20).

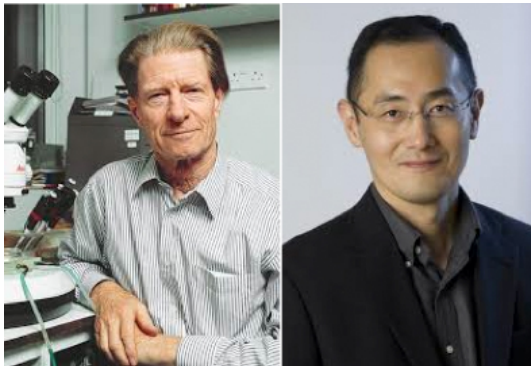


Figura 2. John Bertrand Gurdon y Shinya Yamanaka.

Las técnicas modernas han permitido conocer el estado de la cromatina en las células madre pluripotentes y los cambios epigenéticos que se producen durante la reprogramación celular. Para que se produzca correctamente la reprogramación de una célula somática a una célula iPS se tienen que perder marcas epigenéticas típicas de la célula somática, y adquirir las modificaciones que permitan la pluripotencia celular. Una marca epigenética que está “instalada” en las células somáticas y es clave en la generación de células iPS es la metilación del ADN. Durante la reprogramación, la activación endógena de genes pluripotentes como **Oct4** se produce por la desmetilación de sus regiones promotoras, habiéndose comprobado que una desmetilación global insuficiente da lugar a una reprogramación parcial. La **primera reprogramación de células en el interior de un organismo vivo** (un ratón transgénico), realizada en **2013** por el Grupo de Supresión Tumoral del CNIO liderado por **Manuel Serrano**, ha demostrado que en ella están implicados los mismos factores que en la reprogramación *in vitro*, pero además, tiene lugar un daño celular por el que las células entran en senescencia y empiezan a segregar ciertos factores, como la interleuquina 6, que promueven la reprogramación de las células vecinas (21).

4. LA OVEJA DOLLY Y LA CLONACIÓN HUMANA TERAPÉUTICA

La técnica de transferencia nuclear iniciada por Gurdon permitió a los biólogos **Ian Wilmut** y **Keith Campell**, que trabajaban en el Instituto Roslin de Edimburgo, realizar la clonación de una oveja a partir de una célula adulta ya diferenciada (Figura 3).



Figura 3. Ian Wilmut y Keith Campell.

Como ya se ha comentado, en la técnica de transferencia nuclear se elimina el núcleo de una célula somática de cualquier tipo, salvo óvulos o espermatozoides, y se introduce en una célula de un ovocito cuyo núcleo se ha eliminado previamente. En la **oveja Dolly**, la célula somática procedía de la glándula mamaria de una oveja de seis años cuyo núcleo se transfirió a un óvulo no fecundado y enucleado. Después de la transferencia, el núcleo puede reprogramarse adicionando factores que lo empujan a actuar como el

núcleo de un huevo fertilizado o cigoto, y empieza a dividirse tras someterlo a un ligero estímulo eléctrico formando un blastocisto que se implanta en un animal hospedador (otra oveja en este caso), donde se desarrolla hasta que se produce el nacimiento. Hay que mencionar que Dolly fue el único cordero resultante de 277 transferencias.

Con este animal nació también una revolución científica y social; se clonaron primero ratones, y luego vacas, cabras, cerdos, caballos, perros, hurones y camellos (22). Desafortunadamente, muchos de los animales clonados adultos mostraban cambios genéticos que parecían hacer inviábiles a las futuras generaciones y, además, sus telómeros tenían el mismo acortamiento que mostraban las células somáticas cuyo núcleo se había extraído. Éste fue el caso de Dolly, sacrificada a los seis años de su nacimiento a causa de un cáncer de pulmón. Parecía que el reloj biológico se había reiniciado de forma incompleta; sin embargo, la discusión parece que se ha cerrado con la demostración de que los animales clonados no tienen necesariamente una vejez acelerada, y parece existir un mecanismo natural incorporado a los óvulos que es capaz de rejuvenecer una célula (23).

Como no podía ser de otro modo, tras la clonación de mamíferos le llegó el turno a la **clonación humana**, que supone la producción asexual de un ser humano con una carga genética casi idéntica a la de un individuo ya existente. Tradicionalmente se ha distinguido la **clonación reproductora** de la **clonación terapéutica**. En la primera, se pretende la creación de un nuevo ser humano nacido a partir del embrión clonado, mientras que en la segunda se pretenden desarrollar nuevos tratamientos para las enfermedades. Las células pluripotentes de los blastocistos de embriones clonados derivados de un paciente podrían utilizarse en teoría para reemplazar sus tejidos dañados, sin que se produzca el rechazo por su sistema inmune. Muchos científicos son entusiastas respecto a estas técnicas, pero otros piensan que supondrían más perjuicios que beneficios. Entre los primeros se encuentra **Robert Lanza** (Figura 4), actualmente Presidente del *Astellas Institute for Regenerative Medicine* en Massachusetts (dentro de la compañía japonesa Astellas Pharma).

Esta historia podría comenzar en los años 2001 y 2002, cuando el Dr. **J. B. Cibelli** (figura 4) y sus colaboradores describieron un primer intento de clonación de embriones humanos (24). Su éxito fue muy relativo porque solo lograron obtener mediante la técnica de transferencia de núcleos tres embriones humanos que no llegaban a desarrollarse más allá del estadio de 6 células. Por eso tuvo un gran impacto la publicación en 2004 y 2005 de los trabajos realizados en la Universidad Nacional de Seúl por el Dr. **Woo-suk Hwang** (Figura 4) y colaboradores, comunicando la obtención de muchos embriones clónicos humanos por transferencia nuclear de una célula somática, y la derivación de líneas celulares a partir de las células troncales pluripotentes de sus blastocistos (25). Esta noticia provocó un terremoto en el mundo científico y

médico, porque abría la puerta a la **clonación terapéutica**. En la primera de estas publicaciones se comunicaba que estas líneas celulares, denominadas SCNT-hES-1, eran capaces de diferenciarse para dar embrioides *in vitro* y de formar *in vivo* teratomas en ratones inmunodeprimidos conteniendo derivados celulares de las tres capas embrionarias germinales. Después de su proliferación, eran idénticas genéticamente a las células somáticas que habían donado su núcleo, aunque no se excluía por completo la posibilidad de que tuvieran un origen partenogenético (que procedieran de un óvulo sin germinar). En la segunda publicación, se informaba que habían creado 11 líneas celulares humanas troncales embrionarias (hESC) a partir de 31 blastocistos de embriones obtenidos por transferencia de los núcleos de células de la piel de pacientes afectados por diversas enfermedades a ovocitos humanos. Estas células, transferidas al donante del núcleo o a otro individuo, se establecían rápidamente.

El gobierno surcoreano otorgó a Hwang 3 millones de dólares para que pudiera seguir con sus investigaciones durante cinco años, poniéndolo al frente del primer banco mundial de células madre. En mayo de 2004, la revista *Nature* denunció que algunos de los ovocitos utilizados en las investigaciones de Hwang habían sido donados por científicas de su laboratorio, pero fueron más trascendentes otras denuncias, particularmente la de que nueve de las once líneas celulares que decía haber creado eran falsas y que las otras dos eran células madre embrionarias tomadas de su laboratorio. En enero de 2006, una comisión de investigación promovida al efecto por la Universidad de Seúl, comunicó que había encontrado **graves fallos en los procedimientos, pruebas simuladas y datos falsos** y, lamentando “un acto grave que daña la base de la ciencia”, confirmó que el experimento de clonación de embriones humanos era fraudulento, y que la mayor parte del material genético utilizado en las clonaciones no coincidía con el ADN del supuesto donante. Sin embargo, confirmó como válida la clonación de un perro anunciada por Hwang en la revista *Nature* en agosto de 2005 (26). Hwang dimitió como profesor de dicha universidad en diciembre del 2005, la revista *Science* publicó un editorial retractándose de los dos artículos en Junio de 2006 (27), y su editor en jefe afirmó en un comunicado que consideraría incluir nuevos requisitos para la publicación de artículos e informes por parte de los científicos, como detallar las contribuciones específicas de todos los implicados en la investigación enviada y firmar declaraciones en las que afirmaran estar de acuerdo con las conclusiones de sus respectivos artículos. Esta última exigencia pretendía sin duda evitar una práctica bastante común: la de incluir como coautores de un trabajo a investigadores de renombre en un área determinada. Corea del Sur prohibió además la investigación con células madre embrionarias hasta que en marzo de 2007 levantó el veto con la condición de utilizar solo óvulos descartados de inseminaciones artificiales.

El objetivo de lograr la clonación terapéutica parece

más próximo desde que en el año 2013 el científico de origen ruso **Shoukhrat Mitalipov** (Figura 4), continuando con sus estudios con primates en el Centro Nacional de Oregón para la investigación de Primates, lograra obtener un embrión humano del que derivaron células madre (28). Para ello utilizó una solución enriquecida con cafeína de óvulos de gran calidad procedentes de voluntarias sanas a los que retiró el núcleo, introduciendo después en su citoplasma el núcleo de un fibroblasto de un paciente con síndrome de Leigh, finalizando con su electroestimulación (29). La cafeína es un inhibidor de las fosfatasa y es efectiva para prevenir la activación prematura de los ovocitos durante el proceso de transferencia nuclear. El portal Internet PubPeer, una plataforma en la que se pueden trasladar opiniones de forma anónima sobre estudios científicos, acusó a **Mitalipov** y a los autores de este trabajo de haber repetido imágenes y de confundir los tipos celulares que se mostraban con pies de fotos erróneos, pero se ha concluido que los autores solo incurrieron en pequeños errores en el proceso de preparación de los datos y no hay fallos que tengan impacto en los hallazgos científicos de la investigación (30).



Figura 4. José Cibelli, Robert Lanza, Woo-suk Hwang y Shoukhrat Mitalipov.

Respecto a las distintas técnicas que pueden utilizarse para obtener células pluripotentes útiles en la Medicina Reparadora, hay que decir que las células IVF-ES representan al “patrón oro”, pero son alogénicas para los pacientes y presentan problemas éticos. La obtención de células iPS no requiere disponer de un óvulo, pero su aplicación clínica está actualmente plagada de escollos ya que son a menudo defectuosas en su diferenciación, contienen patrones aberrantes de metilación, y adquieren mutaciones somáticas. Hasta el momento, el procedimiento de Mitalipov parece una alternativa más costosa que la obtención de células iPS por el procedimiento de Yamanaka, pero puede que sea más productiva. El grupo de Mitalipov ha comparado genéticamente las células IVF-ES con las NT-ES y las iPS, encontrando que las dos últimas contenían una comparable cantidad de variaciones en el número de copias *de novo*, pero los perfiles de reparación del ADN y del transcriptoma de las NT-ES se correspondían con los de las células IVF-ES mientras que diferían en las iPS, que mantenían patrones residuales de metilación del ADN similares a los de las células de las que procedían (31). En conclusión, las células somáticas humanas pueden ser reprogramadas a la pluripotencia con mayor fiabilidad utilizando las células NT-ES, y la clonación con fines

terapéuticos es idónea para la medicina regeneradora.

Uno de los objetivos prioritarios de la Medicina Regeneradora es la generación de **células productoras de insulina** para tratar la diabetes, y en su búsqueda se están empleando tanto las técnicas de clonación como la técnica de Yamanaka modificada. El año **2014**, científicos del *New York Stem Cell Foundation Research Institute* y del *Silberman Institute of Life Sciences* de Jerusalén, consiguieron **células β pancreáticas** transformando las células troncales de **embriones humanos clonados** procedentes de un ovocito. El núcleo de éste se reemplazó por el de una célula de la piel de una paciente de 33 años con diabetes tipo 1 (32). Cuando estas células se trasplantaron a ratones deficientes en células β , éstos lograron controlar la glucosa. En un futuro, se pretende estudiar esta estrategia con pacientes diabéticos fabricando las células β a partir de las “propias células del paciente” y el ovocito de una donante. Actualmente, las células productoras de insulina que se trasplantan a pacientes diabéticos proceden de cadáveres y su cantidad es limitada. Además, han de administrarse junto a fármacos inmunosupresores para evitar el rechazo, ya que el sistema inmunológico de los diabéticos tipo 1 las destruye. Es posible que las células obtenidas por clonación humana sean mejor aceptadas por el sistema inmune, aunque todavía no se sabe con certeza.

Éste y otros hallazgos procedentes de estudios de clonación humana sugieren que podría ser inminente algo que advierten hace tiempo la Iglesia Católica y otros defensores del derecho a la vida: que los científicos comiencen a crear indiscriminadamente embriones humanos a petición del consumidor. Con la técnica de Mitalipov no se ha logrado todavía clonar monos y, por tanto, tampoco se podrían clonar personas, pero la **clonación humana** ya no parece una idea tan descabellada: si ya se ha conseguido con éxito un embrión, el siguiente paso podría ser implantarlo en un útero y crear un clon.

En cuanto a la técnica de Yamanaka, aunque los científicos habían conseguido producir células pre-beta, éstas no eran funcionales porque las células β pancreáticas humanas requieren una maduración post-natal para que segreguen la máxima cantidad de insulina en respuesta a la glucosa. El año **2016**, un equipo del Instituto Salk de California liderado por **Ronald Evans** buscó la existencia de algún factor clave que determinara el paso de una célula pre-beta inmadura a una célula β madura y funcional, descubriendo que la expresión del receptor γ vinculado a los receptores estrogénicos (**estrogen-related receptor, ERR γ**) es una característica de las células β adultas. La inducción postnatal de la proteína ERR γ activa la fosforilación oxidativa mitocondrial, la cadena de transporte electrónico y la producción de ATP, necesarias para la secreción de insulina en presencia de glucosa. De acuerdo con este descubrimiento, cuando se añadió ERR γ a células pre-beta creadas en el laboratorio por la técnica de Yamanaka, se comprobó que respondían a la glucosa y producían insulina *in vitro* (33). Estas células trasplantadas

a ratones deficientes en células β , fueron capaces de revertir la diabetes, pero no se sabe todavía si funcionarán en humanos.

5. ESTUDIOS SOBRE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Cuando un organismo empieza a desarrollarse, el blastocisto sufre un proceso llamado **gastrulación** que lo transforma en una estructura sólida con tres capas que van a dar lugar a tres partes del organismo adulto diferentes. El sistema nervioso, por ejemplo, es inicialmente una delgada tira de tejido situada en la capa externa o ectodermo que se engrosa y expande, plegándose sobre sí misma, para originar lo que finalmente será el cerebro, la médula espinal, la retina y la neurohipófisis, mientras que el resto del ectodermo originará los tejidos epiteliales y las células de la cresta neural.

Las investigaciones sobre el desarrollo embrionario del cerebro comenzaron en los años **1920** con los estudios sobre la conversión de embriones de rana en renacuajos realizados por el alemán **Hans Spemann**. Éste encontró que al dividir en dos uno de estos embriones solo daba lugar a un renacuajo la mitad que contenía una porción de tejido que organizaba la gastrulación. Esta porción de tejido se denominó “**organizador de Spemann**” o labio dorsal, que en los vertebrados determina la posición de la médula espinal. En otros experimentos, Spemann trasplantó tejidos de embriones de tritón a embriones de salamandra, o viceversa, observando que al transferir el tejido organizador se formaba un *body axis* secundario y finalmente un segundo sistema nervioso. En estos últimos experimentos fue trascendental el trabajo de la entonces doctoranda **Hilde Proescholdt** (de casada **Hilde Mangold**, Figura 5) que, utilizando huevos de especies de salamandra que difieren en su pigmentación, demostró la inducción de gemelos siameses y comprobó que el segundo sistema nervioso procedía del tejido del animal hospedador, no del donante, lo que significaba que el tejido organizador inducía de algún modo la formación de tejido nervioso en las células vecinas a él (34). Todas estas investigaciones fueron la base para la concesión a Spemann del **Premio Nobel de Fisiología o Medicina en 1935**, galardón que no pudo compartir Hilda Mangold por su fallecimiento prematuro, ocurrido el mismo año en que se publicaron sus resultados.



Figura 5. Hans Spemann y Hilde Mangold.

A partir de 1924, los embriólogos asumieron que el organizador de Spemann secreta una proteína que induce la formación del sistema nervioso, e intentaron encontrarla durante casi 70 años. A principios de 1990 dos equipos de investigación observaron que el organizador de Spemann segregaba dos proteínas distintas: **folistatina**, una glicoproteína aislada del líquido folicular ovárico que se expresa en casi todos los tejidos de los animales superiores, y **nogina**, cuyas funciones están asociadas al desarrollo de la cabeza embrionaria (35). Sorprendentemente, en vez de inducir alguna actividad, estas proteínas revertían el bloqueo de otro grupo de proteínas que en condiciones normales evita que las células del ectodermo se conviertan en neuronas inmaduras, originando en su lugar tejido epitelial. Esto quiere decir que las neuronas inmaduras se producen gracias a que folistatina y nogina impiden que el ectodermo origine exclusivamente tejidos epidérmicos (36).

En 1994 **Yoshiki Sasai** (Figura 6), graduado en Medicina en la Universidad de Kyoto en 1986, se incorporó como investigador posdoctoral al laboratorio del embriólogo **Edward De Robertis** en la Universidad de California Los Angeles, donde trabajó hasta 1996. De Robertis había hecho sus estudios posdoctorales con Gurdon, en el *Medical Research Council* del Reino Unido, y junto con **Walter Gehring**, había aislado en 1984 el **gen Hox-C6**, que controla el desarrollo de los vertebrados y determina la diferenciación entre la parte anterior (cabeza) y la posterior (cola) (37). A los pocos meses de su llegada a California, Sasai había participado en el aislamiento del **gen cordina** (38), que produce otra proteína del mismo nombre. Segregada por células dorsales, la cordina facilita el transporte de factores de crecimiento a la región ventral del embrión donde, tras ser digerida por una proteasa, los libera. Este fenómeno determina la diferenciación entre la región dorsal y ventral en muchos animales (39).

Tras su vuelta a Japón, los éxitos científicos del equipo de Sasai en sus esfuerzos para imitar el desarrollo de los órganos *in vitro* fueron notables. Haciendo crecer células troncales embrionarias de ratón en un entorno tridimensional, y utilizando medios de cultivo específicos para los distintos tejidos, las células se organizaban espontáneamente de manera análoga a lo que ocurre en los embriones en crecimiento. De este modo, el equipo fue capaz de generar una copa óptica (cuya pared interna da lugar a la retina en el desarrollo embriológico del ojo), algunas partes del córtex cerebral, los rudimentos de un cerebelo, y tejido de glándula pituitaria. En el primer caso, el experimento se repitió partiendo de células troncales embrionarias humanas, generando células epiteliales que crecieron casi en el mismo orden en que lo hicieron las de ratón, aunque la copa óptica “humana” tenía un tamaño mucho mayor. Primero formaron una vesícula, luego una bolsa, y luego la copa óptica con una pared externa (el epitelio de la retina) y una interna con una estructura multicapa con múltiples tipos de células

entre las que se encontraban células fotorreceptoras (sensibles a la luz) (40). El propio Sasai mostraba su asombro ante la autoorganización de las células con estas palabras: “*We still can't explain why the cells come together to make an eye. There must be more principles that we still don't understand yet. It's something that makes me completely in awe of life*”.

En el año 2014 el equipo de la oftalmóloga **Masayo Takahashi**, siguiendo las pautas de Sasai, implantó por primera vez en el interior del ojo de una paciente con degeneración macular una lámina del **pigmento epitelial de la retina** que se había diferenciado a partir de células iPS originadas por reversión al estado pluripotente de fibroblastos de la piel (41). Un año más tarde, el trasplante permanecía intacto y la agudeza visual no había mejorado, pero tampoco empeorado (42). Un equipo de Corea del Sur, que utilizó una técnica análoga en cuatro pacientes asiáticos, tampoco observó después de un año serios efectos secundarios relacionados con estos trasplantes (43). Actualmente se han extendido las tecnologías que permiten separar y manejar las células que se desean para construir tejidos biológicos *in vitro*, así como las aplicaciones clínicas de éstos (44).



Figura 6. Yoshiki Sasai.

6. LA TRAGEDIA DE LAS CÉLULAS STAP (*STIMULUS-TRIGGERED ACQUISITION OF PLURIPOTENCY*).

Los fraudes científicos pueden deberse en algún caso a un exceso de confianza u orgullo personal, pero es más probable que hayan sido la consecuencia de un hábito que se ha ido adquiriendo. El investigador quiere demostrar que está en lo cierto y que el trabajo y el dinero invertidos están justificados, lo que supone que sigue siendo competitivo. El problema es que apearde de esos hábitos parece difícil. Afortunadamente, la experimentación científica es muy eficaz a la hora de demostrar los errores y de corregirlos, como demuestra la historia de las células Stap.

Sasai había colaborado en el año 2000 a la creación del Centro para el Desarrollo Biológico (C.D.B.) dentro del prestigioso Instituto Riken en la ciudad de Kobe, y con su prestigio ayudó a mantener su financiación. RIKEN es la abreviatura de su primitivo nombre: *Rikagaku Kenkyujo*, que significa literalmente: "Instituto de Investigación Física y Química" y se remonta a 1917 (45). Semejante en cierta medida al Consejo Superior de Investigaciones

Científicas español, fue relevante durante la segunda Guerra Mundial porque el ejército japonés llevó a cabo en algunas de sus instalaciones el programa para fabricar su bomba atómica. Tras muchas vicisitudes, RIKEN se ha expandido desde los años 80 creando nuevos laboratorios y centros en Japón y en el extranjero.

Con el tiempo, **Sasai** empezó a colaborar en una tecnología basada en someter las células ordinarias a estrés. Aparentemente, las células que sobrevivían a ciertos estímulos externos como una bajada transitoria de pH podían transformarse en células madre, lo que implicaba que habían adquirido la pluripotencia. Se podrían conseguir, sin necesidad de una transferencia nuclear ni de adicionar factores de transcripción, células madre adultas genéticamente idénticas en apenas media hora. Este presunto descubrimiento sugería la existencia en el organismo de un mecanismo que hacía posible la regeneración de partes del cuerpo sin riesgo de rechazo por el sistema inmune y sin los problemas éticos de las células troncales embrionarias, por lo que estaba llamado a revolucionar la medicina regenerativa. Sasai era supervisor de **Haruko Obokata** (Figura 7), una joven de 31 años que investigaba en el competitivo mundo de las células madre. Tras lograr el título de *Bachelor of Science* en 2006 y finalizar sus estudios en el Departamento de Química Aplicada de la Escuela de Ciencias e Ingeniería, obtuvo en 2008 el título de *Master of Science in Applied Chemistry* en la Universidad de Waseda, realizó dos años de investigaciones dirigidas al estudio de células madre en la *Harvard Medical School* de Boston bajo la dirección de **Charles Vacanti** (Figura 7), y regresó a la Universidad de Waseda para completar en 2011 su doctorado en Ingeniería como investigadora invitada en el C.D.B., del que fue nombrada responsable del Laboratorio para la Reprogramación Celular en el año 2013.



Figura 7. Haruko Obokata, Charles Vacanti y Teruhiko Wakayama.

Realmente, la idea de desarrollar las células Stap había surgido a principios de los años 2000 de la imaginación de Charles Vacanti. Este investigador tenía, además de otros tres hermanos médicos como él, un hermano que nació con síndrome de Down, lo que le motivó a pensar en la posibilidad de aumentar su capacidad mental extrayendo células de su cerebro, eliminando en ellas la copia extra del cromosoma 21 que las caracteriza, y volviéndolas a inyectar. Decidió utilizar primero células madre aisladas de tejido neuronal con la ayuda de su hermano Martin, pero ninguno de los dos tenía experiencia previa en esta labor. Quizás por eso, al observar la transformación de

células adultas en unas células semejantes a esporas tras ser sometidas a un intenso estrés, postularon la hipótesis de que éstas podrían sobrevivir en condiciones extremas, desarrollarse, y diferenciarse en células con las características propias del tejido del que fueron aisladas. Estas células podrían permanecer dormidas en un organismo hasta que se activaran por algún daño induciéndolas a regenerar el tejido dañado (46). Fue entonces cuando Charles Vacanti incorporó a su laboratorio de Boston a Haruki Obokata, conocida como una auténtica “manitas” en las técnicas de laboratorio.

Entusiasmada con la idea de su mentor, desarrolló su tesis concluyendo que estas células eran capaces de originar teratomas, lo que indicaba que eran pluripotentes. Para publicar estos resultados en una revista importante contactaron con el Dr. **Teruhiko Wakayama** (Figura 7), que entonces trabajaba en el C.D.B., proponiéndole la creación de un **ratón quimérico** que se originaría tras la inyección de células alteradas por el estrés en un embrión de ratón. Utilizando la técnica que creó a la oveja Dolly, Wakayama había encontrado el modo de producir 581 ratones sanos, clones de un “donante” original, a través de 25 clonaciones consecutivas. Esto fue posible gracias a que su grupo había observado que **en las histonas de las células naturales la acetilación de las histonas persiste a lo largo de toda su vida, mientras que en los núcleos somáticos las histonas se desacetilan completamente**. Esto supone una disfunción en el control epigenético, que hace a su ADN difícilmente accesible durante la división celular, por lo que la adición de inhibidores de histona desacetilasa promueve el desarrollo del estadio de blastocisto. Wakayama superó la inviabilidad de sus ratones administrando a las células clonadas el inhibidor de histona desacetilasa tricostatina A (47, 48).

Vacanti, Obokata y Wakayama enviaron los resultados de estos trabajos a la revista *Nature*, pero su publicación se rechazó argumentando que **no estaba probado que las células procedían de la conversión de células adultas**, y que quizás las muestras se habían contaminado con células madre embrionarias. La impaciencia y aspiraciones de estos científicos crecieron cuando en otoño se concedió el Premio Nobel a Yamanaka. Surgieron discrepancias entre los miembros del grupo y finalmente Sasai, que tenía entonces 52 años y era el subdirector del Centro, se convenció del interés del trabajo y de que con su ayuda como supervisor de Obokata se podría publicar. Fue entonces cuando estas células fueron bautizadas como **células Stap (*Stimulus-triggered acquisition of pluripotency*)**, se incorporó un nuevo protocolo utilizando como agente productor de estrés ácido clorhídrico en vez del ATP que se utilizaba con anterioridad, se realizó algún experimento adicional, y se grabó un video de cámara rápida en el que las células del ratón se transformaban cambiando de un color gris a uno verde. A principios del año 2014, estos resultados originaron dos publicaciones en la revista *Nature* (49). En el resumen de la primera de ellas se decía literalmente: *Through real-time imaging of STAP*

cells derived from purified lymphocytes, as well as gene rearrangement analysis, we found that committed somatic cells give rise to STAP cells by reprogramming rather than selection. STAP cells showed a substantial decrease in DNA methylation in the regulatory regions of pluripotency marker genes. Blastocyst injection showed that STAP cells efficiently contribute to chimaeric embryos and to offspring via germline transmission. We also demonstrate the derivation of robustly expandable pluripotent cell lines from STAP cells. Thus, our findings indicate that epigenetic fate determination of mammalian cells can be markedly converted in a context-dependent manner by strong environmental cues.

Obokata fue ensalzada como la nueva Madame Curie japonesa. Sin embargo, cinco meses después, todos los investigadores que intentaron replicar estas experiencias habían sido incapaces de hacerlo, por lo que las dos publicaciones mencionadas tuvieron que retractarse (50). En principio, Obokata negó haber fabricado sus resultados manteniendo que había conseguido células Stap en más de 200 ocasiones y sus colaboradores la apoyaron, pero poco a poco todos fueron retractándose hasta que finalmente también lo hizo ella. Se había demostrado que en el estudio se acumulaban textos plagiados y fotos manipuladas y, lo más importante: que las supuestas células madre estaban contaminadas con células madre embrionarias, de forma que los ratones quiméricos y los teratomas que derivaban supuestamente de las células Stap se debían a estas últimas. La investigadora mantuvo que alguien podría haberlas tomado de un refrigerante y etiquetarlas mal por error.

Uno de los coautores más afectados por estos hechos fue Yoshiki Sasai que, tras estar hospitalizado por depresión, se suicidó junto a su laboratorio el 5 de agosto de 2014. En su sepelio, el entonces Presidente de RIKEN, **Ryōji Noyori (Premio Nobel de Química del año 2001)** dijo: *“The scientific world has lost a talented and dedicated researcher, who earned our deep respect for the advanced research he carried out over many years.”*

Una de las tres notas de despedida que dejó Sasai iba dirigida a Obokata. En ella le pedía que asegurara que las células Stap podían reproducirse, por lo que el Instituto Riken le permitió que intentara reproducir su trabajo bajo la supervisión estricta de varios investigadores. En diciembre tuvo que admitir que se habían falsificado y fabricado los datos y que las llamadas células Stap eran células troncales embrionarias, sin poder demostrar si la contaminación era o no accidental. El Instituto admitió que había fallado el sistema de supervisión del CDB, despidió a Obokata, e introdujo cambios radicales en su organización que incluyeron un recorte del 40% de su financiación y el cierre de muchos laboratorios. En noviembre de 2015 la Universidad de Waseda, que había fijado el 31 de octubre como plazo para que Obokata corrigiera su tesis, le retiró el doctorado.

El final de esta historia nos recuerda a la tragedia griega, que cumplía su función educativa tratando de conmovier a los espectadores a través, por ejemplo, de la

némesis que los dioses infligían a los mortales dominados por la soberbia.

7. AGRADECIMIENTOS

La autora quiere expresar su agradecimiento al Dr. Lacadena, que se prestó amablemente a comentar esta revisión y a proporcionarme algunos datos, además de influir con sus escritos y conferencias en su interés por la genética y el desarrollo de la vida humana.

8. REFERENCIAS

- Judson HF. "Anatomía del fraude científico". Editorial Barcelona: Crítica, 2006.
- Baquero F. "Quince citas con la Ciencia". Conmemoración del decimoquinto aniversario de la Fundación Lilly en España, 2017.
- Avendaño C. Reflections about the scientific process. *An Real Acad Farm.* 2017; 83: 6-9.
- Aida L. Alexis Carrel (1873–1944): visionary vascular surgeon and pioneer in organ transplantation. *J Med Biorg.* 2014; 22: 172-5.
- Carrel A. On the permanent life of tissues outside the organism. *J Exp Med.* 1912; 15: 516-8.
- Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 1961; 25: 585-621.
- Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Experimental Cell Research* 1965; 37: 614-36.
- a) Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70. b) Shay JW, Gazdar AF, Telomerase in the early detection of cancer. *J Clin Pathol.* 2004; 50: 106-9.
- Avendaño C, Menéndez JC. Telomerase inhibitors and other anticancer approaches targeting telomeres. En "Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs", (second edition), Ed. Elsevier 2015; Chapter 7, pág. 311-6.
- a) Wright WE, Hayflick L. The regulation of cellular aging by nuclear events in cultured normal human fibroblasts (WI-38). *Adv Exp Med Biol.* 1975; 61: 39-55. b) Hayflick L. "How and Why We Age". Ballantine Books Reprint ed. 1996; ISBN 0-345-40155-7.
- Hayflick L, Stanbridge E. Isolation and identification of mycoplasma from human clinical materials. *Ann New York Acad of Sciences* 1967; 143: 608-21.
- Hayflick L. NIH Settlement. *Science* 1982; 215: 240-2.
- Hu Y, Fu L. Targeting cancer stem cells: a new therapy to cure cancer patients. *Am J Cancer Res* 2012; 2: 340-56.
- Moris N, Pina C, Martínez A. Transition states and cell fate decisions in epigenetic landscapes. *Nat Rev Genetics* 2016; 17: 693-703.
- a) Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 1958; 182: 64-5. b) Gurdon JB. The transplantation of nuclei between two species of *Xenopus*. *Developmental Biology* 1962; 6: 68-83.
- Taylor SM, Jones PA. Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 1979; 17: 771-9.
- Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51: 987-1000.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126:663-76.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131: 861-72.
- Mosteiro L, Pantoja C, Alcázar N, *et al.* Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science* 2016; 354: aaf4445.
- Nisar A, Wani U, Wernery FAH, *et al.* Production of the First Cloned Camel by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Biol Reprod.* 2010; 82: 373-9.
- Sinclair KD, Corr SA, Gutierrez CG, *et al.* Healthy ageing of cloned sheep. *Nature Commun.* 2016; 7: 12359.
- a) Cibelli JB, Kiessling AA, Cunniff K, *et al.* Somatic cell nuclear transfer in humans: Pronuclear and early embryonic development. *E-biomed: The Journal of Regenerative Medicine* 2001; 2: 25-31. b) Cibelli JB, Lanza RP, West MD, Ezzell C. The first human cloned embryo. *Scient Amer.* 2002; 286: 42-9.
- a) Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, *et al.* Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 2004; 303: 1669-74. b) Hwang WS, Roh S, Lee BC, *et al.* Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science* 2005; 308: 1777-83.
- Lacadena JR. Fraudes científicos: Ética de la investigación. En "Genética y Bioética", Página web del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (Abril, 2006). <http://ntic.educacion.es/w3/tematicas/genetica>.
- Kennedy D. Editorial Expression of Concern. *Science* 2006; 311: 36.
- Lacadena JR. ¿Un paso adelante hacia la clonación humana con fines terapéuticos? *An Real Acad Farm.* 2013; 79: 241-52.
- Masahito Tachibana, Paula Amato, Michelle Sparman, *et al.* Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell* 2013; 153: 1228-38.
- Lacadena JR, ¿Un paso adelante hacia la clonación humana con fines terapéuticos?: una agenda. *An Real Acad Farm.* 2014; 80: 644-8.

31. Ma H, Morey R, O'Neil RV, *et al.* Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature* 2014; 511: 177-83.
32. Yamada M, Johannesson B, Sagi I, *et al.* Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature* 2014; 510: 533-6.
33. Yoshihara E, Z, CS, *et al.* $ERR\gamma$ Is Required for the Metabolic Maturation of Therapeutically Functional Glucose-Responsive β Cells. *Cell Metabolism* 2016; 23: 622-34.
34. Spemann H, Mangold H. Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from a different species. *Roux's Arch Entw Mech.* 1924; 100: 599-638.
35. Oppenheimer SB. The Discovery of Noggin. *The American Biology Teacher* 1995; 57: 264-6.
36. Lumsden AG, Davies AM. Earliest sensory nerve fibres are guided to peripheral targets by attractants other than nerve growth factor. *Nature* 1983; 306: 786-8.
37. Carrasco AE, McGinnis W, Gehring WJ, De Robertis EM. Cloning of a *Xenopus laevis* gene expressed during early embryogenesis that codes for a peptide region homologous to *Drosophila* homeotic genes: implications for vertebrate development. *Cell* 1984; 37: 409-14.
38. Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, Geissert, *et al.* *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* 1994; 79: 779-90.
39. a) Piccolo S, Sasai Y, Lu B, De Robertis EM. Dorsoventral patterning in *Xenopus*: Inhibition of ventral signals by direct binding of Chordin to BMP-4. *Cell* 1996; 86: 589-98. b) Piccolo S, Agius E, Lu B, *et al.* Cleavage of Chordin by the Xolloid metalloprotease suggests a role for proteolytic processing in the regulation of Spemann organizer activity. *Cell* 1997; 91: 407-16. c) De Robertis EM. Spemann's organizer and self-regulation in amphibian embryos. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7: 296-302.
40. a) Stem cells: Human eye parts in a dish. *Nature* 2012; 486: 297.
b) Nakano T, Ando S, Takata N, *et al.* Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 771- 85. c) Cyranoski D. *Nature News* 2012: 10835.
41. Reardon S, Cyranoski D. Japan stem-cell trial stirs envy. *Nature* 2014; 513: 287-8.
42. Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, *et al.* Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med* 2017; 376: 1038-46.
43. Song WK, Park K-M, Kim H-J, *et al.* Treatment of Macular Degeneration Using Embryonic Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium: Preliminary Results in Asian Patients. *Stem Cell Reports.* 2015; 4: 860-72.
44. Arai T, Arai F, Yamato M. *Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems.* Springer Japan 2015; eBook ISBN: 9784431552970.
45. Tsuji T (Ed.). *Laboratory for Organ Regeneration, RIKEN Center for Developmental Biology, Kobe, Japan. "Organ Regeneration Based on Developmental Biology".* Springer Singapur 2017; ISBN: 9789811037689.
46. Vacanti MP, Roy A, Cortiella J, Bonassar L, Vacanti CA. Identification and initial characterization of spore-like cells in adult mammals. *J Cell Biochem.* 2001; 80: 455-60.
47. Yoshida M, Kijima M, Akita M, *et al.* Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and *in vitro* by trichostatin A. *J Biol Chem.* 1990; 265:17174-9.
48. S, Kohda T, H, *et al.* Successful Serial Recloning in the Mouse over Multiple Generations. *Cell Stem Cell* 2013; 12, 293-7.
49. a) Obokata H, Wakayama T, Sasai Y, Kojima K, Vacanti MP, Niwa H, Yamato M, Vacanti CA. Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature* 2014; 505: 641-7. b) Obokata H, Sasai Y, Niwa H, *et al.* Bidirectional developmental potential in reprogrammed cells with acquired pluripotency. *Nature* 2014; 505: 676-80.
50. a) Obokata H, Wakayama T, Sasai Y, *et al.* Retraction: Stimulus-triggered fate conversion of somatic cells into pluripotency. *Nature* 2014; 511: 112. b) Obokata H, Sasai Y, Niwa H, *et al.* Retraction: bidirectional developmental potential in reprogrammed cells with acquired pluripotency. *Nature* 2014; 511: 112.