



REIAL ACADEMIA DE DOCTORS

Células Madre y Medicina Regenerativa

*

Discurso de ingreso del académico correspondiente

Excmo. Sr. Dr. Juan Carlos Izpisúa Belmonte

Doctor en Farmacia

En el acto de la su recepción, 27 de octubre de 2009,

y

discurso de contestación por el Académico Numerario

Excmo. Sr. Dr. Joaquim Gironella i Coll

Doctor en Medicina

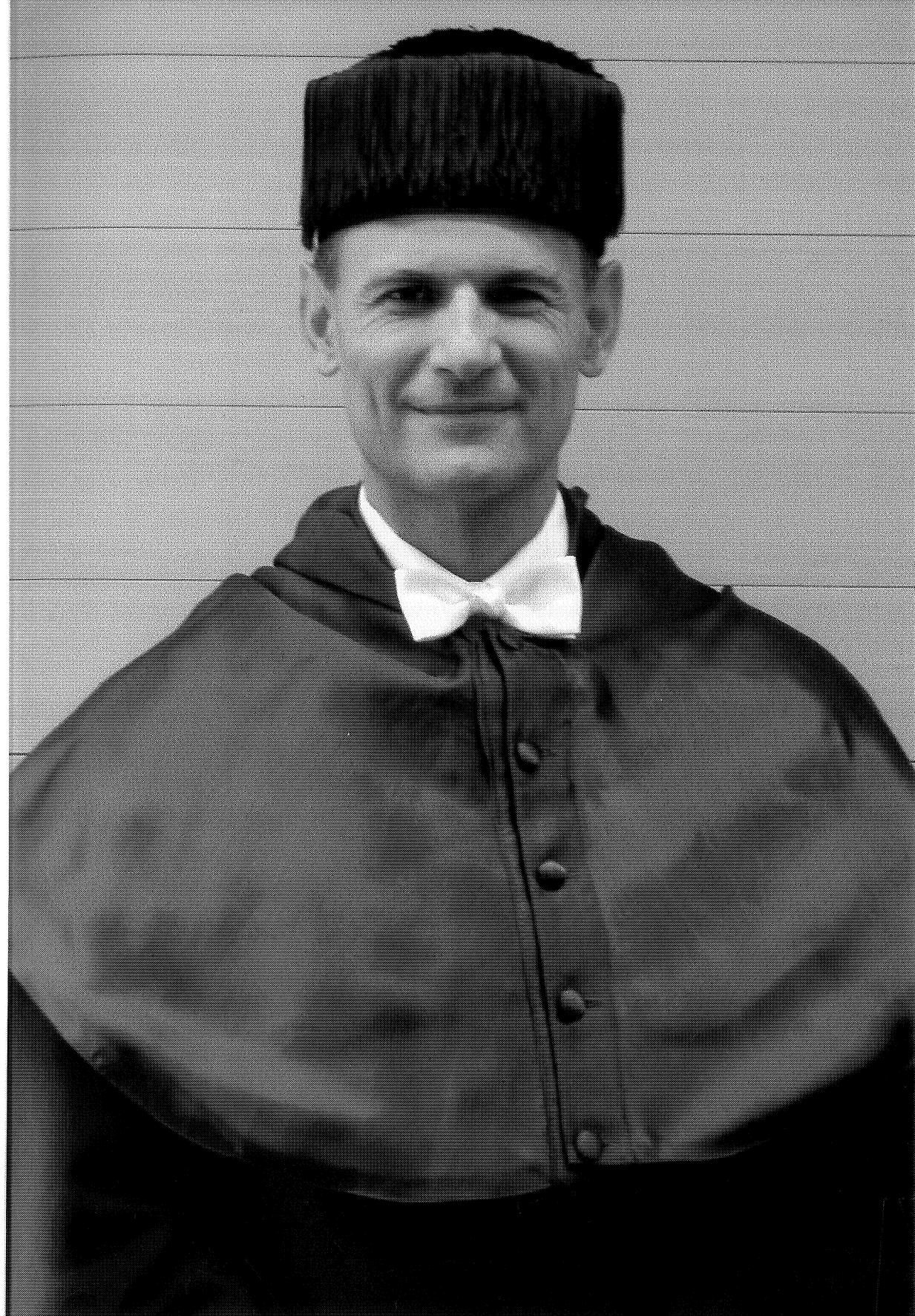
Barcelona

2009

Dr. Juan Carlos Izpisúa Belmonte

Células Madre y Medicina Regenativa

REIAL ACADÈMIA DE DOCTORS
-Publicacions-



Excelentísimo Señor Decano Presidente,
Excelentísimo seniores académicos,
Excelentísimos y ilustrísimos señores,
Señoras y señores.

El primer deber al ingresar solememente en esta docta corporación, es de agradecimiento al señor presidente de la Reial Acadèmia de Doctors, el Excm. Sr. Josep Casajuana, a la junta directiva y a todos los académicos que me han honrado con la elección de mi persona para formar parte de su corporación. También quisiera agradecer a todos los presentes por su asistencia a un acto tan importante para un académico.

La Reial Acadèmia de Doctors es una institución histórica, construida con el tesón y el trabajo de muchos intelectuales y profesionales que se han distinguido por su calidad científica, profesional y espíritu multidisciplinario. Es para mí un gran honor pertenecer a esta academia, y poder compartir momentos con los otros miembros de la Academia. Nuevamente muchas gracias por la benevolencia y esplendidez a los cuales intentaré responder con mi ferviente compromiso personal.

Sin más preámbulos, y con la venia del señor presidente, iniciaré mi discurso de ingreso en la Reial Acadèmia, que tendrá como objeto el papel de la células madre en la medicina regenerativa, y que desde hace años estudio con la esperanza y el compromiso personal de mejorar la salud de los enfermos.

CELULAS MADRE Y MEDICINA REGENERATIVA

Precursors hematopoyéticos libres de enfermedad diferenciados a partir de células de pluripotencia inducida de pacientes afectos de Anemia de Fanconi.

La generación de Células Madre Pluripotentes Inducidas (iPS) ha permitido la obtención de células madre pluripotentes paciente-específicas y ha proporcionado valiosas plataformas experimentales como modelos de enfermedades humanas. Se considera que las iPS paciente-específicas tienen, además, un gran potencial terapéutico, aunque aún no existe una evidencia directa. Nuestro trabajo indica que, tras la corrección del defecto genético, células somáticas de pacientes con anemia de Fanconi pueden ser reprogramadas para generar células iPS paciente-específicas. Estas líneas celulares no se diferencian de las células madre embrionarias humanas y de las células iPS de individuos sanos. Más importante aún, demostramos que las células específicas iPS con anemia de Fanconi corregidas pueden dar lugar a progenitores hematopoyéticos de los linajes mieloides y eritroides fenotípicamente normales, es decir, sanos. Estos datos demuestran que se puede utilizar la tecnología de las células iPS para generar células paciente-específicas corregidas con un gran valor potencial para su aplicación en terapia celular.

La posibilidad de reprogramar células somáticas maduras para generar células iPS¹⁻⁵ ha permitido la

derivación células pluripotentes enfermedad-específicas, y por tanto proporcionan plataformas experimentales sin precedentes como modelos de enfermedades humanas⁶⁻⁹. Adicionalmente, la generación de las células iPS paciente-específicas puede tener una amplia gama de aplicaciones en terapia génica y celular, y podría ser especialmente relevante para el tratamiento del síndromes hereditarios de insuficiencia de médula ósea (BMF), en los que la disminución progresiva del número células madre hematopoyéticas (HSC) limita la producción de células de sangre periférica.

Entre los diversos síndromes de BMF, la anemia de Fanconi (FA) es la más común¹⁰. La FA es una enfermedad rara, autosómica recesiva o ligada al cromosoma X, causada por mutaciones en cualquiera de los 13 genes identificados hasta ahora en la vía de la FA¹¹. Las células de estos pacientes muestran la típica inestabilidad e hipersensibilidad cromosómicas a los agentes crosslinking del DNA, características que se utilizan para diagnosticar la FA¹². La mayoría de los pacientes con FA desarrollan BMF, que aparece normalmente durante la primera década de vida, y algunos pacientes muestran una predisposición creciente a desarrollar ciertas malignidades (incidencia acumulativa de aprox. 30% a los 40 años de edad)¹³. Actualmente, la terapia para BMF en pacientes con FA consiste en el trasplante de injertos hematopoyéticos de HLA-identicos, mientras que los trasplantes de donantes no relacionados es más limitado^{14,15}. El mosaicismo somático, que actúa como una terapia génica natural en los pacientes con FA, demostró que la corrección genética supone una ventaja selectiva en cuanto al crecimiento de HSCs en pacientes con FA. Un proceso que puede restaurar el sistema hematopoyético

del paciente con células fenotípicamente normales¹⁶⁻¹⁸. También se ha observado una ventaja selectiva en cuanto a la proliferación en ratones con FA después de la corrección genética ex vivo de sus HSCs con vectores lentivirales¹⁹. A pesar de estas observaciones, los ensayos mediante terapia génica realizados hasta ahora en pacientes con FA no han tenido éxito clínicamente^{20,21}, debido a la falta y a la mala calidad de HSCs en la médula de los pacientes con FA²⁰⁻²³.

Como consecuencia de la inestabilidad genética de las células FA, los defectos genéticos producidos antes de la corrección con terapia genética no se repararían. Sin embargo, la generación de células iPS FA-específicas corregidas, a partir de la reprogramación de células somáticas no hematopoyéticas, darían lugar a la producción de una gran cantidad de HSCs autólogas, genéticamente estables que se pueden utilizar para tratar BMF en pacientes con FA.

Generación de células iPS paciente-específicas

Se obtuvieron muestras a partir de seis pacientes con FA, cuatro del grupo FA-A (pacientes FA5, FA90, FA153 y FA404) y dos del grupo FA-D2 (FA430 y FA431). Las muestras de los pacientes FA5, FA90, FA153, FA430 y FA431 fueron los fibroblastos de la dermis primarios críopreservados sometidos a un número indeterminado de pases. Del paciente FA404 se obtuvo una biopsia de la piel, de la cual se estableció los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos y queratinocitos epidérmicos. Primero se intentó optimizar el protocolo de reprogramación usando fibroblastos de prepucio

obtenidos mediante una biopsia de un donante sano (véase información adicional y Fig. suplementaria 1).

Nuestro protocolo mejorado de reprogramación consistió en dos secuencias de infección con retrovirus mouse-stem-cell-virus-based que codificaban las versiones amino-terminales etiquetadas con marcadores OCT4 (también conocido como POU5F1), SOX2, KLF4 y c-MYC (también conocidos como MYC), realizados en 6 días. Los fibroblastos transducidos fueron pasados después de 5 días sobre una monocapa de fibroblastos humanos (feeders) y al día siguiente se les cambió el medio a medio de células embrionarias humanas (ES). También incluimos un paso de selección basado en la inhibición combinada de MAP2K1 y de GSK3B con los inhibidores PD0325901y CT99021 (una combinación llamada 2i que mejora la derivación y el crecimiento de las células madre de ratón²⁴) durante 1 semana, comenzando 1 semana después de iniciar el cultivo sobre feeders. Debido a la inestabilidad genética y la predisposición apoptótica de células FA²⁵, las células somáticas fueron reprogramadas de dos maneras; directamente o después de la corrección genética con los vectores lentivirales portadores de FANCA o FANCD2, respectivamente. Hemos demostrado previamente que la complementación genética de las células FA humanas y de ratón con estos vectores, corrige eficientemente el fenotipo FA^{19,23,26}. No hemos conseguido obtener colonias de iPS a partir de fibroblastos de los pacientes FA5, FA153 o FA430, ni sin modificar ni corregidas, tras al menos cinco intentos de reprogramación, probablemente debido a que las células acumulaban demasiados pases y/o a las anomalías cromosómicas (Tabla Suplementaria 1). Sin embargo, obtuvimos fácilmente colonias de iPS del paciente FA90 al

usar fibroblastos corregidos genéticamente (fig.1a). En resumen, obtuvimos 10-15 colonias de iPS en 3 experimentos independientes. De éstas, escogimos aleatoriamente diez colonias, todas ellas pudieron ser ampliadas con éxito y crecieron como colonias morfológicamente idénticas a las células madre humanas (fig. 1b) y se mostraron claramente positivas para la actividad fosfatasa alcalina (fig. 1c). Cinco de estas líneas (cFA90-44-1, -11, -14, -20 y -21) fueron seleccionadas para la caracterización adicional. Todas mostraron un cariotipo normal (46, XX) en los pasos 12-16 y se mantuvieron en cultivo por lo menos durante 20 pasos. En el momento de la redacción de este artículo, cFA90-44-14 había experimentado 43 pasos sin muestras de crisis replicativa, mientras que mantenía un cariotipo normal (fig. suplementaria 2). Los análisis de la inmunofluorescencia de las cinco líneas revelaron la expresión de los factores de transcripción (OCT4, SOX2, NANOG) y los marcadores superficiales (SSEA3, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81) característicos de las células pluripotenciales (fig. 1d-f y fig. suplementaria 3).

Se obtuvieron resultados similares con las células somáticas de otro paciente con FA-A, el paciente FA404. Los fibroblastos transducidos con los lentivirus portadores de FANCA (fig. 1g) fueron reprogramados fácilmente para generar células iPS (fig. 1h). Se estableció dos líneas celulares (cFA404-FiPS4F1 y cFA404-FiPS4F2), que mostraron las características típicas en cuanto a morfología y crecimiento, de las células madre humanas. Se tiñeron claramente positivas para la actividad fosfatasa alcalina y expresaron todos los marcadores asociados a pluripotencia testados (fig. 1i-l y fig. suplementaria 4). Del paciente FA404 también se derivó los queratinocitos

epidérmicos primarios, que se reprogramaron usando un protocolo establecido recientemente en nuestro laboratorio²⁷. Generamos tres líneas celulares iPS (cFA404-KiPS4F1, - KiPS4F3 y - KiPS4F6) de los queratinocitos genéticamente corregidos, que mostraron todas las características principales de las auténticas células iPS y las células madre embrionarias ES (fig. suplementaria 4) y cariotipo normal 46 XY (fig. suplementaria 2).

Asimismo conseguimos buenos resultados con la reprogramación de fibroblastos del paciente FA431 (fig. suplementaria 5a), un paciente FA-D2. En este caso, las colonias aparecieron en números aproximadamente iguales tanto de los fibroblastos sin modificar como de los genéticamente corregidos (Tabla suplementaria 1). Escogimos dos colonias de cada tipo que crecieron tras pasarlas y se tiñeron positivamente para la actividad fosfatasa alcalina (fig. suplementaria 5c, g). Sin embargo, mientras que las derivadas de fibroblastos corregidos (cFA431-44-1 y cFA431-44-2) se mantuvieron en cultivo por un periodo de tiempo extendido (18 pases en el momento de redacción de este artículo), y mostraron la expresión de los factores de pluripotencia asociada a marcadores de transcripción y de membrana (Fig. suplementarios 5d-f y datos no demostrados), las células derivadas de los fibroblastos sin modificar experimentaron un retraso progresivo del crecimiento y no se pudieron mantener después del tercer pase (fig. suplementaria 5g). El hecho de que los fibroblastos sin corregir FA-D2 del paciente FA431 podrían ser reprogramados, mientras que no pudieron serlo los de los pacientes FA90 o FA404, se podría explicar por el hecho de que los pacientes FA-D2, y en particular FA431, llevaban las mutaciones hipomórficas compatibles con la expresión de la proteína residual FANCD2²⁸. Por lo tanto,

parece ser que la restauración de la vía FA es un prerequisito para la generación de células iPS a partir de células somáticas de los pacientes con FA (en total, acertamos con éxito 12 de 28 intentos independientes de reprogramación al usar las células genéticamente corregidas – incluyendo los pacientes para quienes no acertamos la reprogramación- versus 0 de 28 intentos acertados, cuando se utilizaron las células sin corregir; χ^2 [1] =15.27, P=9.3 X10⁻⁵).

Caracterización de las células iPS

De las 19 líneas celulares FA-iPS generadas en estos estudios, se seleccionaron 10 para una caracterización más completa (Tabla suplementaria 1). Confirmamos la presencia de los transgenes reprogramados integrados en su genoma por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del DNA genómico (fig. 2a y fig. suplementaria 6), así como el origen de las líneas celulares iPS comparando su HLA y microsatélites de DNA con los de las células somáticas de los pacientes (Tabla suplementaria 2). En todas las líneas analizadas, la expresión transgénica de los cuatro factores de reprogramación fue reducida a unos niveles muy bajos o imperceptibles, comparado con una línea celular iPS (KiPS4F3) en la que previamente se había demostrado que no se había silenciado la expresión retroviral del OCT4 y de c-MYC27 (fig. 2b). Además, todas las líneas celulares de FA-iPS analizadas demostraron la reactivación de la expresión del OCT4 endógeno y SOX2, así como los otros factores pluripotenciales asociados de transcripción, tales como NANOG, REX-1 (también conocido como ZFP42) y CRIPTO (también conocido como TDGF1; Fig. 2c). Aprovechando el hecho de que

nuestros transgenes retrovirales estaban marcados, confirmamos mediante inmunofluorescencia que las células iPS apenas mostraron inmunoreactividad contra el Flag (fig. 2d-g). Finalmente, los promotores de los factores de transcripción OCT4 y NANOG, fuertemente metilados en los fibroblastos de los pacientes, fueron demetilado en las células FA-iPS (fig. 2h), indicando la reprogramación epigenética a la pluripotencialidad. A continuación se analizó la capacidad de la diferenciación de las células FA-iPS. Los cuerpos embrioideos derivados en vitro fueron diferenciados fácilmente a endodermo, ectodermo y mesodermo y teñidos mediante inmunotinción específica para los anticuerpos α -fetoprotein/FOXA2, TuJ1/GFAP y α -actinina, respectivamente (fig. 3a-c, y fig. suplementaria 7). Siguiendo protocolos específicos de diferenciación in vitro, las células iPS dieron lugar a células mesodérmicas especializadas, tales como cardiomiositos latiendo rítmicamente (película suplementaria 1) y células progenitoras hematopoyéticas (véase abajo). También sometimos nuestras células FA-iPS a la prueba más rigurosa disponible para determinar la pluripotencialidad de las células humanas, la formación de teratomas²⁹. Para ello, inyectamos las células de ocho líneas diferentes en los testes de ratones inmunodeprimidos. En todos los casos, se obtuvo teratomas ras 8-10 semanas, formados por estructuras complejas que presentaban las tres principales capas germinales embrionarias, incluyendo formaciones glandulares teñidas positivas para marcadores endodérmicos, estructuras neuronales expresando marcadores neuroectodérmicos, y derivados mesodérmicos, tales como músculos y cartílago (fig. 3d-f, Fig. suplementaria 8 y datos no mostrados). Utilizando análisis comparativos, hemos definido recientemente la diferenciación in vitro y la capacidad de inducción de

teratomas de una variedad de líneas celulares madre humanas pluripotentes normales, incluyendo las células madre embrionarias humanas³⁰ y las células iPS obtenidas de donantes sanos²⁷. En general, no detectamos diferencias evidentes en la capacidad de diferenciación en las líneas celulares FA-iPS comparado con las de las células madre embrionarias humanas o de las células iPS normales.

Las células iPS específicas de FA están libres de enfermedad

De acuerdo con la corrección genética previa de las células somáticas anteriormente utilizadas para la reprogramación, pudimos detectar la presencia de copias integradas de los vectores de terapia genética por PCR cuantitativa del DNA genómico en todas las líneas celulares FA-iPS analizadas (fig. suplementaria 9a). Una preocupación en las estrategias de terapia genética es el posible silenciamiento del transgén correctivo. Por esta razón, elegimos lentivirus como vectores de terapia genética, ya que los transgenes lentivirales son especialmente resistentes al silenciamiento en las células madre embrionarias humanas³¹. Sin embargo, esta resistencia parece depender del promotor utilizado³² y recientemente ha sido observado el silenciamiento casi completo de los transgenes lentivirales en el contexto de la reprogramación inducida^{3,8}. En nuestros experimentos, el lentivirus de FANCA fue silenciado parcialmente en las células FA-iPS, según lo evidenciado por la pérdida de fluorescencia IRES-GFP (internal ribosome entry site-green fluorescent protein) (datos no mostrados), que detectamos en los fibroblastos transducidos (fig.

suplementaria 9b). Sin embargo, el silenciamiento transgénico no era completo, ya que pudimos detectar la expresión de FANCA en todas las líneas celulares FA-iPS analizadas, pero no en los fibroblastos de los pacientes (fig. 4a). Para probar la funcionalidad de la vía de FA en las células FA-iPS, indujimos la acumulación subnuclear de orquillas de replicación bloqueadas mediante irradiación ultravioleta local de alta energía a través de un filtro con poros de 5 μm y comprobamos entonces si FANCD2 fue reclutado a las áreas subnucleares localmente dañadas³³. En esos experimentos, las células similares a fibroblastos derivadas de las células FA-iPS mostraron una relocalización normal de FANCD2 (Fig. 4b). Además, indujimos colapsos en las orquillas de replicación tratando las células FA-iPS derivadas con el inhibidor de replicación del DNA hidroxiurea. También, en este caso, las células derivadas de FA-iPS mostraron una reubicación normal de FANCD2 (fig. suplementaria 10). Estos resultados, junto con la expresión persistente de FANCA en las células FA-iPS, demuestran claramente que las células iPS generadas partir de células somáticas portadoras de FA y genéticamente corregidas, mantienen completamente funcional la vía de FA y son por lo tanto fenotípicamente libres de enfermedad.

Nuestras conclusiones de que las células portadoras de FA solo se reprogramaban con éxito en los casos en los que habían sido transducidas con los lentivirus portadores de FANCA (a pesar de que solo el 35-50% de las células habían sido realmente transducidas con el lentivirus corrector; ver Fig. Suplementaria 9b), y que los transgenes lentivirales no habían sido completamente silenciados en las células FA-iPS, indican que una vía funcional de FA confiere una fuerte ventaja selectiva para la generación

y/o el mantenimiento de las células iPS. Para demostrar esta posibilidad directamente, provocamos un knock down de la expresión transgénica de FANCA en las células FA-iPS mediante la infección lentiviral de FANCA short hairpin RNAs (shRNAs). De los cinco diferentes shRNAs analizados, tres alcanzaron una depleción mayor del 70% de la expresión de FANCA en las células cFA404-KiPS4F3 (fig. 4c). En particular, las células iPS con los niveles más bajos de FANCA dejaron de proliferar después de un pase (fig. 4d). Obtuimos resultados similares con las células cFA90-44-14 (datos no mostrados). Mediante una aproximación complementaria, la depleción transitoria de la expresión de FANCA en las células FA-iPS-derivadas mediante la transfección de pequeños RNA de interferencia (siRNA) supuso una disminución marcada de la proliferación celular (aprox. 7 veces) comparada con las células transfectadas con scramble-siRNA (fig. 4e), y aún era más pronunciado (aprox. 15 veces) en respuesta al daño del DNA inducido por diepoxybutane (fig. 4e). Estos resultados proporcionan la evidencia adicional para el status de nuestras células FA-iPS libre de enfermedad y, revelan un papel previamente inesperado de la vía de FA como un aspecto crítico en el mantenimiento de la auto renovación de las células madre pluripotentes.

Progenitores hematopoyéticos libres de la enfermedad

Para analizar la capacidad de diferenciación a linajes hematopoyéticos de las células FA-iPS, los cuerpos embrioides de seis líneas diferentes (cFA90-44-11 y -44-14, cFA404-FiPS4F2, - KiPS4F1, - KiPS4F3 y - KiPS4F6) fueron

co-cultivados con células estromales OP9³⁴ en presencia de citoquinas hematopoyéticas. En todos los casos, pudimos detectar células CD34⁺ mediante citometría de flujo comenzando el día 5 y alcanzando su punto álgido el día 12 ($7.23 \pm 2.57\%$, n=7). Pudimos detectar asimismo células CD45⁺ en los cultivos del día 10, que alcanzaron $0.95 \pm 0.38\%$ (n=6) el día 12 (Fig. 5a). El momento de aparición y la frecuencia de los progenitores hematopoyéticos obtenidos de las células FA-iPS eran similares al de los obtenidos usando las células iPS de individuos sanos ($7.24 \pm 3.43\%$ de las células CD34⁺ en el día 12, n=5 de 2 líneas celulares iPS independientes) y de células madre embrionarias humanas ($6.62 \pm 1.03\%$ de células CD34⁺ en el día 12, n=5 de 2 líneas independientes de células madre embrionarias humanas; véase también la ref. 35).

Purificamos las células CD34⁺ obtenidas a partir de las FA-iPS el día 12 del protocolo de diferenciación en dos rondas de MACS (magneticactivated cell sorting) para analizar su capacidad de diferenciación hematopoyética en ensayos de progenitor clonogénico. Las células CD34⁺ obtenidas a partir de las FA-iPS generaron grandes colonias eritroides (Burst-forming unit-erithroid (BFU-E)) y mieloide (unidad formadora de colonia de granulocitos, monocitos (CFU-GM)) (fig. 5b, c). La naturaleza mieloide de las colonias CFU-GM fue confirmada por la expresión de los marcadores CD33 y CD45 en estas colonias (Fig. 5d). El potencial hematopoyético de las células CD34⁺ obtenidas a partir de las FA-iPS era sólido y los números de células formadoras de colonias (CFCs) obtenidos en análisis clonogénicos eran comparables a los obtenidos de las células CD34⁺ derivadas de células madre embrionarias humanas o de células iPS control (Fig. 5e,

barras sólidas). Estos resultados indican que las células FA-iPS se diferenciaron con éxito en los progenitores hematopoyéticos de los linajes eritroides y mieloides. Asimismo intentamos generar células sanguíneas en ratones NOD-SCID (nonobese diabetic/severe combined immunodeficient) trasplantados con células CD34⁺ obtenidas a partir de las FA-iPS, pero no se observó colonización de los precursores, coincidiendo con lo previamente descrito en cuanto a la limitación técnica para la recolonización de ratones inmunodeficientes con células madre embrionarias humanas diferenciadas *in vitro*³⁶.

Para analizar si los progenitores hematopoyéticos diferenciados de FA-iPS mantenían el fenotipo libre de enfermedad de las células FA-iPS, colonias hematopoyéticas fueron cultivadas en presencia de mitomicina C, porque la hipersensibilidad del DNA a los agentes crosslinking es una característica de las células de la FA¹². La proporción de colonias resistentes a la mitomicina C obtenidas de las células CD34⁺ obtenidas a partir de las FA-iPS era similar a la obtenida de las células mononucleares de médula ósea de donantes sanos, o de las células madre embrionarias humanas o de las células CD34⁺ obtenidas a partir de las FA-iPS control, y contrastó claramente con la hipersensibilidad a la mitomicina C demostrado por las células mononucleares de medula ósea de pacientes afectos para FA (fig. 5e, las barras blancas). Además, las células CD34⁺ obtenidas a partir de las FA-iPS podían formar focos nucleares después de la exposición a la mitomicina C (fig. 5f), demostrando una vía funcional de la FA.

Discusión

Antes de poder desarrollar el uso clínico de las estrategias basadas en iPS, es necesario resolver una serie de limitaciones. A pesar de ser el método actualmente más eficiente para generar células iPS humanas, la transducción retroviral de células somáticas adultas con OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC da lugar a integraciones permanentes e indeseables de estos transgenes. Aunque estos transgenes se acaban silenciando durante el proceso de reprogramación, su reactivación durante la diferenciación celular (particularmente la del proto-oncogen c-MYC) ha sido asociada a la formación de tumores³⁷. Es posible generar células iPS humanas sin c-MYC, pero la eficiencia de reprogramación en este caso se reduce considerablemente^{27, 38}. Para comprobar si las células FA-iPS podían ser generadas sin c-MYC, utilizamos queratinocitos primarios del paciente FA404. Después de tres intentos de reprogramación, generamos una línea celular iPS (cFA404-KiPS3F1), que fue expandida de forma robusta y demostró poseer todas las características y la capacidad de diferenciación de las células iPS generadas con cuatro factores, y dio lugar a progenitores hematopoyéticos *in vitro* (Fig. suplementaria 11). Según lo esperado, el genoma de las células cFA404-KiPS3F1 no contenía las integraciones del retrovirus de c-MYC, como muestra la hibridación por Southern realizada con sondas específicas para los factores de reprogramación (Fig. suplementaria 12) y la PCR del DNA genómico (datos no mostrados). Estos resultados muestran que células iPS específicas de pacientes “más seguras” pueden ser generadas con tan solo tres factores, aunque con eficiencias que podrían ser no compatibles con su aplicación práctica. Además e idealmente, se

debería evitar la modificación permanente del genoma de las células iPS, y omitir del todo la integración de los retrovirus. La reciente implementación de protocolos de reprogramación que no dependen de la integración viral³⁹⁻⁴², si su aplicabilidad a células humanas se confirmara, nos acercaría a esta posibilidad. El uso de células iPS específicas del paciente para generar células corregidas libres de enfermedad podría superar potencialmente los riesgos de la oncogénesis insercional⁴³ que actualmente es una de las limitaciones de las estrategias de terapia génica, ya que las células iPS corregidas genéticamente permiten la detección de los lugares seguros de integración de los transgenes terapéuticos. Además, se podría utilizar la recombinación homóloga⁴⁴ para corregir los defectos genéticos de las células iPS específicas del paciente. Nuestros estudios revelan asimismo un papel crítico de la ruta de FA en la auto renovación de las células madre pluripotentes, que nosotros postulamos que proporciona una fuerte ventaja de selección de las células iPS que no han silenciado completamente el transgen terapéutico. Se debería considerar cuidadosamente la capacidad de las células madre humanas pluripotentes de silenciar los transgenes virales cuando se piense en el diseño de las futuras estrategias de terapia génica basadas en células iPS para las enfermedades en las que la corrección genética no confiere una ventaja de selección.

Resumen de los Métodos

Después de la aprobación por las autoridades competentes, se obtuvieron células somáticas de pacientes de FA. Los pacientes FA5, FA90 y FA153 fueron previamente descritos⁴⁵; los pacientes FA430 y FA431

corresponden a los pacientes 2 y 10, respectivamente, en la referencia 28. El paciente FA404 fue reclutado recientemente para el estudio y clasificado según los métodos estándar⁴⁵. Las células somáticas fueron reprogramadas con los retrovirus de OCT4, SOX2 y KLF4, con o sin c-MYC (T58A), que contienen la secuencia Flag. Los vectores lentivirales para la terapia génica usados para corregir las células somáticas de FA fueron previamente descritos²⁶ y fueron preparados esencialmente como está descrito⁴⁶. La caracterización de las células iPS se realizó esencialmente como está descrito^{27,30}. La funcionalidad de la ruta de FA se evaluó mediante irradiación local de ultravioleta-C (UVC) esencialmente como está descrito³³. La diferenciación hematopoyética de las células iPS se realizó mediante co-cultivo de los cuerpos embrionarios sobre las células de estroma OP9³⁴ en presencia de BMP4, VEGF, ligando Kit, FGF2, TPO y ligando Flt. Para realizar el knock down de la expresión de FANCA, se empleó la transfección transiente de FANCA siRNA (ref. 47) como está descrito⁴⁸, con luciferasa siRNA como control, o mediante la liberación lentiviral de cinco FANCA shRNAs (Sigma, MISSION shRNA NM_000135) diferentes, usando shRNA aleatorio como control.

Figura 1 | Derivación de las células madre pluripotentes inducidas específicas de pacientes con anemia de Fanconi. **a-f**, Reprogramación exitosa de los fibroblastos cutáneos primarios genéticamente corregidos (**a**) derivados del paciente FA90. **b**, Colonia de células iPS de la línea cFA90-44-14 crecida en placas con Matrigel mostrando morfología de tipo célula madre embrionaria humana. **c-f**, La misma línea celular iPS muestra tinción fuerte para la fosfatasa alcalina (**c**) y expresión de los

factores de transcripción OCT4 (d), SOX2 (e) y NANOG (f) y los marcadores superficiales SSEA3 (d, e) y SSEA4 (f). g, Fibroblastos genéticamente corregidos del paciente FA404. h, Colonia de células iPS de la línea cFA404-FiPS4F1 crecida sobre células de soporte mostrando la morfología típica de célula madre embrionaria humana. I-L, La misma línea celular iPS muestra tinción fuerte para la fosfatasa alcalina (i) y la expresión de los factores de transcripción asociados a la pluripotencia OCT4 (j), SOX2 (k) y NANOG (l) y los marcadores superficiales SSEA3 (j), SSEA4 (k) y TRA1-80 (l). Los núcleos celulares se contratiñeron con 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) en d-f y j-l. Barras de escala, 100 μ m (a, c-g, I-L) y 250 μ m (b, h).

Figura 2 | Caracterización molecular de las líneas celulares FA-iPS. a, PCR de ADN genómico para detectar la integración de los transgenes retrovirales indicados en las líneas celulares FA-iPS cFA90-44-14 (cFA90) y cFA404-FiPS4F1 (cFA404). Se utilizaron los fibroblastos genéticamente corregidos (Fibr.) del paciente FA404 antes de la reprogramación como un control negativo. b, c, PCR cuantitativa con los análisis de transcripción reversa (RT-PCR) de los niveles de expresión de los factores de reprogramación derivados de retrovirus (b) y de los niveles de expresión total de los factores de reprogramación y los factores de transcripción asociados a la pluripotencia (c) en los fibroblastos (fibr.) de los pacientes indicados y en las líneas celulares FA-iPS. Las células madre embrionarias humanas (ES [4]) y las células iPS parcialmente silenciadas (KiPS4F3) se incluyen como controles. Se representan los niveles de expresión de los transcritos relativos a la expresión de GAPDH. d-g, Colonia de células iPS cFA90-44-14 mostrando altos

niveles de expresión endógena de NANOG (e, canal verde en d) y ausencia de inmunoreactividad contra Flag (f, canal rojo en d). Los núcleos celulares fueron contrateñidos con DAPI (g, canal azul en d). h, Secuenciación genómica por bisulfito de los promotores de OCT4 y de NANOG mostrando demetilación en las líneas celulares FA-iPS cFA90-44-14 y cFA404-KiPS4F3, comparado con los fibroblastos del paciente. Los círculos cerrados y abiertos representan CpGs metiladas y no metiladas, respectivamente, en las posiciones indicadas del promotor. Barra de escala, 100 μ m.

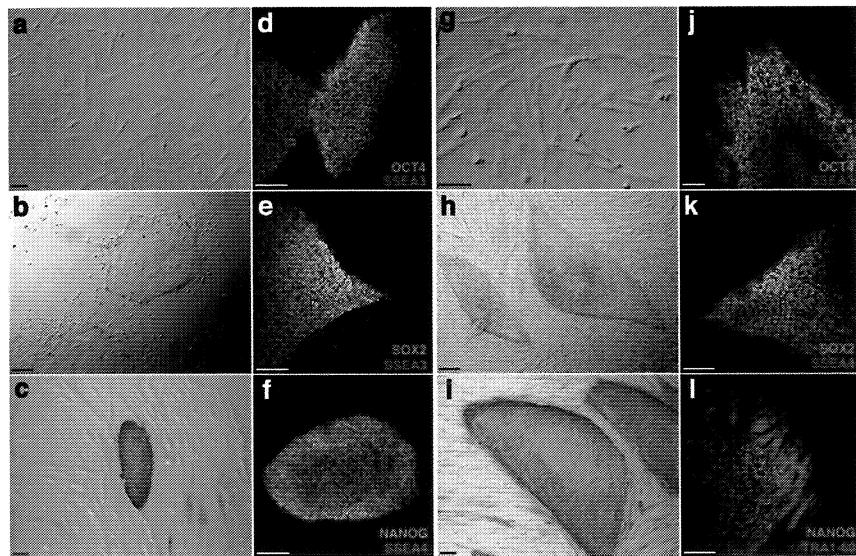
Figura 3 | Pluripotencialidad de las células FA-iPS.
a-c, Experimentos de diferenciación in vitro de las células cFA404-FiPS4F2 iPS revelan su potencial para generar los derivados celulares de las tres capas germinales celulares principales. Los análisis de inmunofluorescencia demuestran la expresión de los marcadores de a, endodermo (α -fetoproteína, verde; FOXA2, rojo), b, neuroectodermo (TuJ1, verde; GFAP, rojo), y, c, mesodermo (α -actinin, rojo). d-f, La inyección de células iPS cFA90-44-14 en los testículos de ratones inmunodeprimidos dan lugar a la formación de teratomas que contienen estructuras que representan a las tres capas germinales embrionarias principales. Derivados del endodermo (d, e) incluyen estructuras glandulares que dan positivo para marcadores de endodermo (α -fetoproteína, verde); derivados del ectodermo (e) incluyen las estructuras que manchan positivo los marcadores neuroectodermos (TuJ1, rojo); derivados del mesodermo (f) incluyen estructuras que dan positivo para marcadores musculares (α -actinin, rojo). Todas las imágenes son del mismo tumor. Barras de escala, 100 μ m. (a, b, d, e) y 25 μ m (c, f).

Figura 4 | Secuencia funcional de FA en las células FA-iPS. **a**, Análisis por Western blot de FANCA en los extractos proteicos de las líneas celulares indicadas, demostrando la expresión de FANCA en las células FA-iPS. Se utilizó la expresión de vinculina como control de carga. hES, ES humanas. **b**, FANCD2 (canal rojo) falla en reubicarse en las horquillas de replicación inducidas por radiación UVC, visualizada mediante inmunofluorescencia con anticuerpos contra los dímeros de la pirimidina del ciclobutano (CPD, canal verde), en fibroblastos del paciente FA404, mientras que muestra una acumulación normal en los sitios dañados en fibroblastos no enfermos (control), en fibroblastos corregidos (cFA404) o en células iPS derivadas de FA (cFA404-FiPS4F2). **c**, Análisis por Western blot de FANCA en los extractos proteicos de células no transducidas cFA404-KiPS4F3 o 6 días después de la transducción con lentivirus expresando un shRNA inespecífico (control) o los shRNAs contra FANCA indicados. Se utilizó la expresión de vinculina como control de carga. Los valores en la parte inferior representan los niveles de expresión de FANCA medidos por cuantificación densitométrica normalizada para la expresión de vinculina y referida a células no transducidas cFA404-KiPS4F3. **d**, Tinción para la fosfatasa alcalina de células cFA404-KiPS4F3 un subclonaje después de ser transducidas con lentivirus expresando un shRNA inespecífico (control) o uno de los shRNAs contra FANCA indicados, una semana después de la siembra. **e**, Valores de índice mitótico en células derivadas de cFA404-FiPS4F2 transfectadas con siRNA inespecífico (control) o con siRNAs contra FANCA e incubado en la ausencia o en presencia de diepoxibutano (DEB). La inserción muestra la depleción de FANCA inducida por los siRNAs contra FANCA en estos

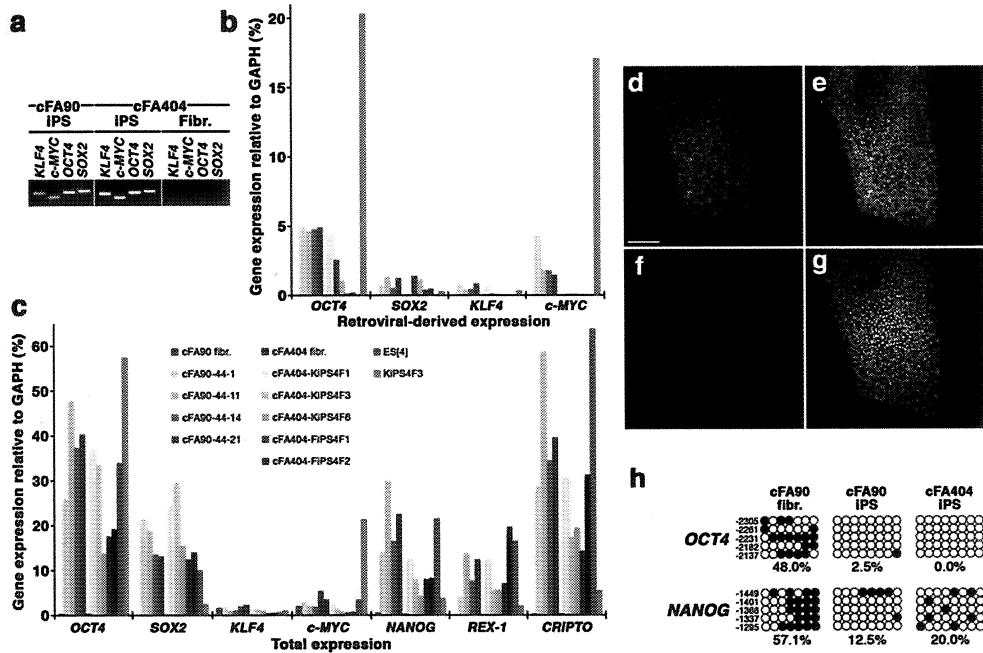
experimentos, según visualizado por Western blot usando vinculina como control de carga. Se presentan los datos como promedio \pm s.d.

Figura 5 | Generación de progenitores hematopoiéticos libres de enfermedad de las líneas celulares FA-iPS. a, Expresión de los marcadores CD34 y CD45 en las células FA-iPS sujetas a diferenciación hematopoiética. b, c, Colonias eritroides (BFU-E) y mieloides (CFU-GM) representativas generadas 14 días después de la incubación de las células iPS derivadas de CD34+ en cultivo semisólido. d, Se confirmó la naturaleza mieloide de las colonias CFU-GM por la co-expresión de los marcadores CD33 y CD45 en las colonias de CFU-GM. e, Número total de CFCs generadas en ausencia y en presencia de mitomicina C a 10nM (MMC) de células CD34+ derivadas de las líneas celulares FA-iPS indicadas. A modo de comparación, se realizaron también los análisis clonogénicos utilizando progenitores hematopoiéticos de donantes sanos (células purificadas de sangre de cordón umbilical CD34+ de dos donantes independientes, CB CD34+; y células de la médula óssea mononucleares, BM MNC), de un paciente con FA y de células CD34+ derivadas de células madre pluripotentes humanas control, incluyendo células madre embrionarias humanas ES[2] (hES) y células KiPS4F1 (kiPS). f, Análisis de inmunofluorescencia mostrando los focos FANCD2 en las células CD34+ derivadas de las líneas celulares FA-iPS (línea cFA90-44-14) tratadas con mitomicina C.

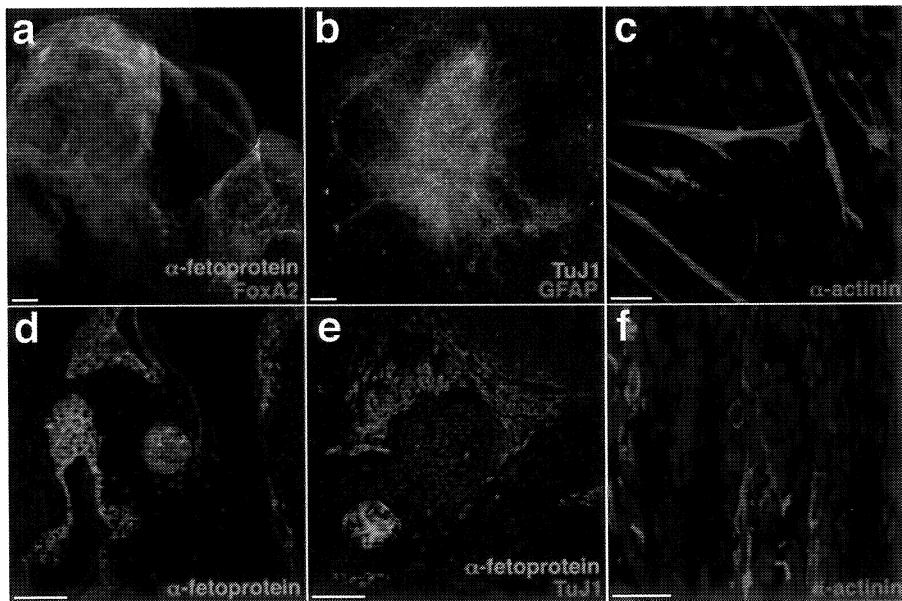
Raya et al. Fig. 1



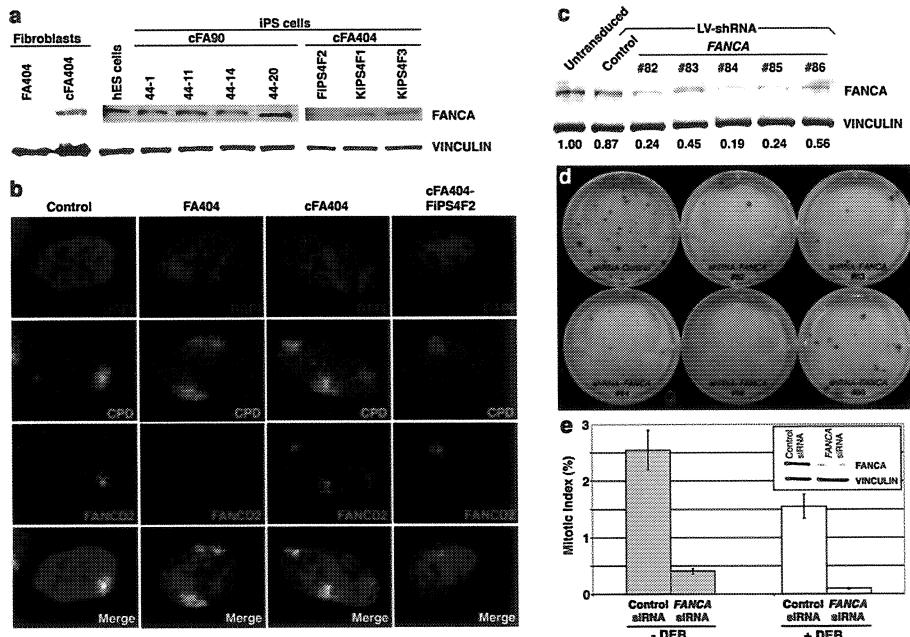
Raya et al. Fig. 2



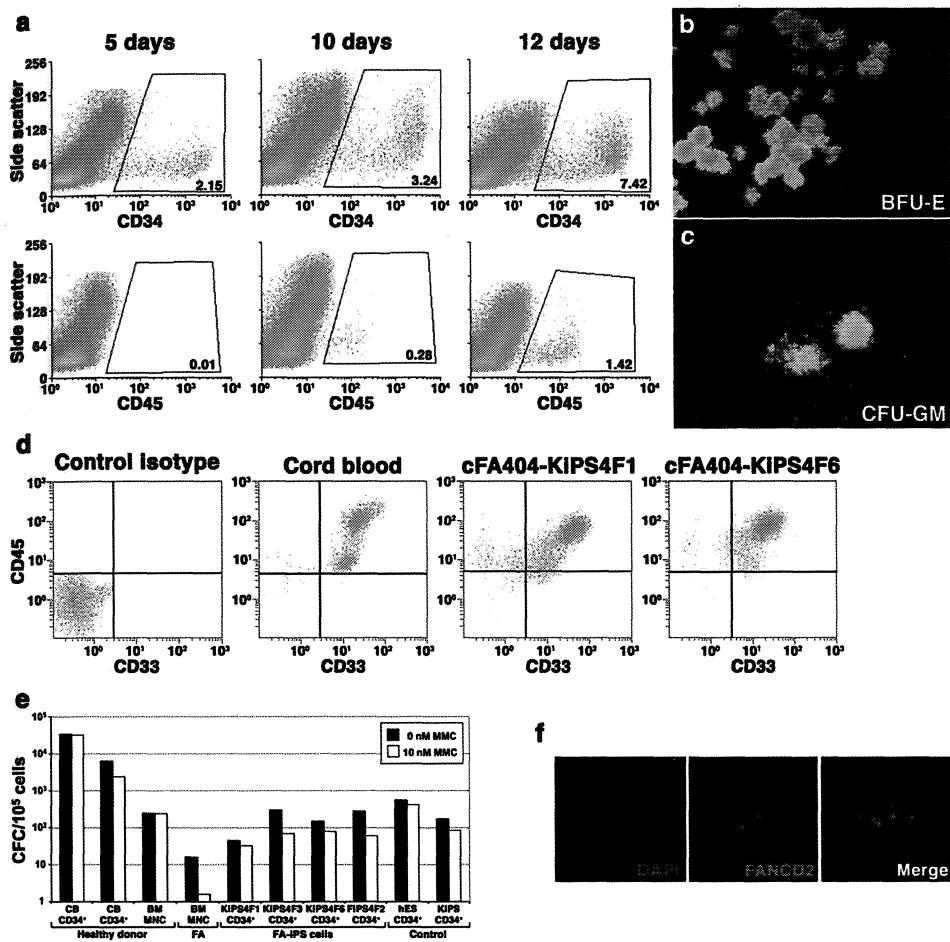
Raya et al. Fig. 3



Raya et al. Fig. 4



Raya et al. Fig. 5



Precursores hematopoyéticos libres de enfermedad diferenciados a partir de células de pluripotencia inducida de pacientes afectos de Anemia de Fanconi.

La generación de Células Madre Pluripotentes Inducidas (iPS) ha permitido la obtención de células madre pluripotentes paciente-específicas y ha proporcionado valiosas plataformas experimentales como modelos de enfermedades humanas. Se considera que las iPS paciente-específicas tienen, además, un gran potencial terapéutico, aunque aún no existe una evidencia directa. Nuestro trabajo indica que, tras la corrección del defecto genético, células somáticas de pacientes con anemia de Fanconi pueden ser reprogramadas para generar células iPS paciente-específicas. Estas líneas celulares no se diferencian de las células madre embrionarias humanas y de las células iPS de individuos sanos. Más importante aún, demostramos que las células específicas iPS con anemia de Fanconi corregidas pueden dar lugar a progenitores hematopoyéticos de los linajes mieloides y eritroides fenotípicamente normales, es decir, sanos. Estos datos demuestran que se puede utilizar la tecnología de las células iPS para generar células paciente-específicas corregidas con un gran valor potencial para su aplicación en terapia celular.

La posibilidad de reprogramar células somáticas maduras para generar células iPS¹⁻⁵ ha permitido la derivación células pluripotentes enfermedad-específicas, y por tanto proporcionan plataformas experimentales sin precedentes como modelos de enfermedades humanas⁶⁻⁹. Adicionalmente, la generación de las células iPS paciente-específicas puede tener una amplia gama de aplicaciones en terapia génica y celular, y podría ser especialmente

relevante para el tratamiento del síndromes hereditarios de insuficiencia de médula ósea (BMF), en los que la disminución progresiva del número células madre hematopoyéticas (HSC) limita la producción de células de sangre periférica.

Entre los diversos síndromes de BMF, la anemia de Fanconi (FA) es la más común¹⁰. La FA es una enfermedad rara, autosómica recesiva o ligada al cromosoma X, causada por mutaciones en cualquiera de los 13 genes identificados hasta ahora en la vía de la FA¹¹. Las células de estos pacientes muestran la típica inestabilidad e hipersensibilidad cromosómicas a los agentes crosslinking del DNA, características que se utilizan para diagnosticar la FA¹². La mayoría de los pacientes con FA desarrollan BMF, que aparece normalmente durante la primera década de vida, y algunos pacientes muestran una predisposición creciente a desarrollar ciertas malignidades (incidencia acumulativa de aprox. 30% a los 40 años de edad)¹³. Actualmente, la terapia para BMF en pacientes con FA consiste en el trasplante de injertos hematopoyéticos de HLA-identicos, mientras que los trasplantes de donantes no relacionados es más limitado^{14,15}. El mosaicismo somático, que actúa como una terapia génica natural en los pacientes con FA, demostró que la corrección genética supone una ventaja selectiva en cuanto al crecimiento de HSCs en pacientes con FA. Un proceso que puede restaurar el sistema hematopoyético del paciente con células fenotípicamente normales¹⁶⁻¹⁸. También se ha observado una ventaja selectiva en cuanto a la proliferación en ratones con FA después de la corrección genética ex vivo de sus HSCs con vectores lentivirales¹⁹. A pesar de estas observaciones, los ensayos mediante terapia génica realizados hasta ahora en

pacientes con FA no han tenido éxito clínicamente^{20,21}, debido a la falta y a la mala calidad de HSCs en la médula de los pacientes con FA²⁰⁻²³.

Como consecuencia de la inestabilidad genética de las células FA, los defectos genéticos producidos antes de la corrección con terapia genética no se repararían. Sin embargo, la generación de células iPS FA-específicas corregidas, a partir de la reprogramación de células somáticas no hematopoyéticas, darían lugar a la producción de una gran cantidad de HSCs autólogas, genéticamente estables que se pueden utilizar para tratar BMF en pacientes con FA.

Generación de células iPS paciente-específicas

Se obtuvieron muestras a partir de seis pacientes con FA, cuatro del grupo FA-A (pacientes FA5, FA90, FA153 y FA404) y dos del grupo FA-D2 (FA430 y FA431). Las muestras de los pacientes FA5, FA90, FA153, FA430 y FA431 fueron los fibroblastos de la dermis primarios críopreservados sometidos a un número indeterminado de pases. Del paciente FA404 se obtuvo una biopsia de la piel, de la cual se estableció los cultivos primarios de fibroblastos dérmicos y queratinocitos epidérmicos. Primero se intentó optimizar el protocolo de reprogramación usando fibroblastos de prepucio obtenidos mediante una biopsia de un donante sano (véase información adicional y Fig. suplementaria 1). Nuestro protocolo mejorado de reprogramación consistió en dos secuencias de infección con retrovirus mouse-stem-cell-virus-based que codificaban las versiones amino-terminales etiquetadas con marcadores OCT4 (también

conocido como POU5F1), SOX2, KLF4 y c-MYC (también conocidos como MYC), realizados en 6 días. Los fibroblastos transducidos fueron pasados después de 5 días sobre una monocapa de fibroblastos humanos (feeders) y al día siguiente se les cambió el medio a medio de células embrionarias humanas (ES). También incluimos un paso de selección basado en la inhibición combinada de MAP2K1 y de GSK3B con los inhibidores PD0325901 y CT99021 (una combinación llamada 2i que mejora la derivación y el crecimiento de las células madre de ratón²⁴) durante 1 semana, comenzando 1 semana después de iniciar el cultivo sobre feeders. Debido a la inestabilidad genética y la predisposición apoptótica de células FA²⁵, las células somáticas fueron reprogramadas de dos maneras; directamente o después de la corrección genética con los vectores lentivirales portadores de FANCA o FANCD2, respectivamente. Hemos demostrado previamente que la complementación genética de las células FA humanas y de ratón con estos vectores, corrige eficientemente el fenotipo FA^{19,23,26}. No hemos conseguido obtener colonias de iPS a partir de fibroblastos de los pacientes FA5, FA153 o FA430, ni sin modificar ni corregidas, tras al menos cinco intentos de reprogramación, probablemente debido a que las células acumulaban demasiados pases y/o a las anomalías cromosómicas (Tabla Suplementaria 1). Sin embargo, obtuvimos fácilmente colonias de iPS del paciente FA90 al usar fibroblastos corregidos genéticamente (fig.1a). En resumen, obtuvimos 10-15 colonias de iPS en 3 experimentos independientes. De éstas, escogimos aleatoriamente diez colonias, todas ellas pudieron ser ampliadas con éxito y crecieron como colonias morfológicamente idénticas a las células madre humanas (fig. 1b) y se mostraron claramente positivas para la

actividad fosfatasa alcalina (fig. 1c). Cinco de estas líneas (cFA90-44-1, -11, -14, -20 y -21) fueron seleccionadas para la caracterización adicional. Todas mostraron un cariotipo normal (46, XX) en los pasos 12-16 y se mantuvieron en cultivo por lo menos durante 20 pasos. En el momento de la redacción de este artículo, cFA90-44-14 había experimentado 43 pasos sin muestras de crisis replicativa, mientras que mantenía un cariotipo normal (fig. suplementaria 2). Los análisis de la inmunofluorescencia de las cinco líneas revelaron la expresión de los factores de transcripción (OCT4, SOX2, NANOG) y los marcadores superficiales (SSEA3, SSEA4, TRA1-60, TRA1-81) característicos de las células pluripotenciales (fig. 1d-f y fig. suplementaria 3).

Se obtuvieron resultados similares con las células somáticas de otro paciente con FA-A, el paciente FA404. Los fibroblastos transducidos con los lentivirus portadores de FANCA (fig. 1g) fueron reprogramados fácilmente para generar células iPS (fig. 1h). Se establecieron dos líneas celulares (cFA404-FiPS4F1 y cFA404-FiPS4F2), que mostraron las características típicas en cuanto a morfología y crecimiento, de las células madre humanas. Se tiñeron claramente positivas para la actividad fosfatasa alcalina y expresaron todos los marcadores asociados a pluripotencia testados (fig. 1i-l y fig. suplementaria 4). Del paciente FA404 también se derivó los queratinocitos epidérmicos primarios, que se reprogramaron usando un protocolo establecido recientemente en nuestro laboratorio ²⁷. Generamos tres líneas celulares iPS (cFA404-KiPS4F1, - KiPS4F3 y - KiPS4F6) de los queratinocitos genéticamente corregidos, que mostraron todas las características principales de las auténticas células iPS y las células madre embrionarias ES (fig.

suplementaria 4) y cariotipo normal 46 XY (fig. suplementaria 2).

Asimismo conseguimos buenos resultados con la reprogramación de fibroblastos del paciente FA431 (fig. suplementaria 5a), un paciente FA-D2. En este caso, las colonias aparecieron en números aproximadamente iguales tanto de los fibroblastos sin modificar como de los genéticamente corregidos (Tabla suplementaria 1). Escogimos dos colonias de cada tipo que crecieron tras pasarlas y se tiñeron positivamente para la actividad fosfatasa alcalina (fig. suplementaria 5c, g). Sin embargo, mientras que las derivadas de fibroblastos corregidos (cFA431-44-1 y cFA431-44-2) se mantuvieron en cultivo por un periodo de tiempo extendido (18 pases en el momento de redacción de este artículo), y mostraron la expresión de los factores de pluripotencia asociada a marcadores de transcripción y de membrana (Fig. suplementarios 5d-f y datos no demostrados), las células derivadas de los fibroblastos sin modificar experimentaron un retraso progresivo del crecimiento y no se pudieron mantener después del tercer pase (fig. suplementaria 5g). El hecho de que los fibroblastos sin corregir FA-D2 del paciente FA431 podrían ser reprogramados, mientras que no pudieron serlo los de los pacientes FA90 o FA404, se podría explicar por el hecho de que los pacientes FA-D2, y en particular FA431, llevaban las mutaciones hipomórficas compatibles con la expresión de la proteína residual FANCD2²⁸. Por lo tanto, parece ser que la restauración de la vía FA es un prerequisito para la generación de células iPS a partir de células somáticas de los pacientes con FA (en total, acertamos con éxito 12 de 28 intentos independientes de reprogramación al usar las células genéticamente

corregidas – incluyendo los pacientes para quienes no acertamos la reprogramación- versus 0 de 28 intentos acertados, cuando se utilizaron las células sin corregir; χ^2 [1] =15.27, P=9.3 X10-5).

Caracterización de las células iPS

De las 19 líneas celulares FA-iPS generadas en estos estudios, se seleccionaron 10 para una caracterización más completa (Tabla suplementaria 1). Confirmamos la presencia de los transgenes reprogramados integrados en su genoma por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del DNA genómico (fig. 2a y fig. suplementaria 6), así como el origen de las líneas celulares iPS comparando su HLA y microsatélites de DNA con los de las células somáticas de los pacientes (Tabla suplementaria 2). En todas las líneas analizadas, la expresión transgénica de los cuatro factores de reprogramación fue reducida a unos niveles muy bajos o imperceptibles, comparado con una línea celular iPS (KiPS4F3) en la que previamente se había demostrado que no se había silenciado la expresión retroviral del OCT4 y de c-MYC27 (fig. 2b). Además, todas las líneas celulares de FA-iPS analizadas demostraron la reactivación de la expresión del OCT4 endógeno y SOX2, así como los otros factores pluripotenciales asociados de transcripción, tales como NANOG, REX-1 (también conocido como ZFP42) y CRIPTO (también conocido como TDGF1; Fig. 2c). Aprovechando el hecho de que nuestros transgenes retrovirales estaban marcados, confirmamos mediante inmunofluorescencia que las células iPS apenas mostraron inmunoreactividad contra el Flag (fig. 2d-g). Finalmente, los promotores de los factores de transcripción OCT4 y NANOG, fuertemente metilados

en los fibroblastos de los pacientes, fueron demetilado en las células FA-iPS (fig. 2h), indicando la reprogramación epigenética a la pluripotencialidad. A continuación se analizó la capacidad de la diferenciación de las células FA-iPS. Los cuerpos embrioideos derivados en vitro fueron diferenciados fácilmente a endodermo, ectodermo y mesodermo y teñidos mediante inmunotinción específica para los anticuerpos •-fetoprotein/FOXA2, TuJ1/GFAP y •-actinina, respectivamente (fig. 3a-c, y fig. suplementaria 7). Siguiendo protocolos específicos de diferenciación in vitro, las células iPS dieron lugar a células mesodérmicas especializadas, tales como cardiomiositos latiendo rítmicamente (película suplementaria 1) y células progenitoras hematopoyéticas (véase abajo). También sometimos nuestras células FA-iPS a la prueba más rigurosa disponible para determinar la pluripotencialidad de las células humanas, la formación de teratomas²⁹. Para ello, inyectamos las células de ocho líneas diferentes en los testes de ratones inmunodeprimidos. En todos los casos, se obtuvo teratomas ras 8-10 semanas, formados por estructuras complejas que presentaban las tres principales capas germinales embrionarias, incluyendo formaciones glandulares teñidas positivas para marcadores endodérmicos, estructuras neuronales expresando marcadores neuroectodérmicos, y derivados mesodérmicos, tales como músculos y cartílago (fig. 3d-f, Fig. suplementaria 8 y datos no mostrados). Utilizando análisis comparativos, hemos definido recientemente la diferenciación in vitro y la capacidad de inducción de teratomas de una variedad de líneas celulares madre humanas pluripotentes normales, incluyendo las células madre embrionarias humanas³⁰ y las células iPS obtenidas de donantes sanos²⁷. En general, no detectamos diferencias evidentes en la capacidad de diferenciación en

las líneas celulares FA-iPS comparado con las de las células madre embrionarias humanas o de las células iPS normales.

Las células iPS específicas de FA están libres de enfermedad

De acuerdo con la corrección genética previa de las células somáticas anteriormente utilizadas para la reprogramación, pudimos detectar la presencia de copias integradas de los vectores de terapia genética por PCR cuantitativa del DNA genómico en todas las líneas celulares FA-iPS analizadas (fig. suplementaria 9a). Una preocupación en las estrategias de terapia genética es el posible silenciamiento del transgén correctivo. Por esta razón, elegimos lentivirus como vectores de terapia genética, ya que los transgenes lentivirales son especialmente resistentes al silenciamiento en las células madre embrionarias humanas³¹. Sin embargo, esta resistencia parece depender del promotor utilizado³² y recientemente ha sido observado el silenciamiento casi completo de los transgenes lentivirales en el contexto de la reprogramación inducida^{3,8}. En nuestros experimentos, el lentivirus de FANCA fue silenciado parcialmente en las células FA-iPS, según lo evidenciado por la pérdida de fluorescencia IRES-GFP (internal ribosome entry site-green fluorescent protein) (datos no mostrados), que detectamos en los fibroblastos transducidos (fig. suplementaria 9b). Sin embargo, el silenciamiento transgénico no era completo, ya que pudimos detectar la expresión de FANCA en todas las líneas celulares FA-iPS analizadas, pero no en los fibroblastos de los pacientes (fig. 4a). Para probar la funcionalidad de la vía de FA en

las células FA-iPS, indujimos la acumulación subnuclear de orquillas de replicación bloqueadas mediante irradiación ultravioleta local de alta energía a través de un filtro con poros de 5 μm y comprobamos entonces si FANCD2 fue reclutado a las áreas subnucleares localmente dañadas³³. En esos experimentos, las células similares a fibroblastos derivadas de las células FA-iPS mostraron una relocalización normal de FANCD2 (Fig. 4b). Además, indujimos colapsos en las orquillas de replicación tratando las células FA-iPS derivadas con el inhibidor de replicación del DNA hidroxiurea. También, en este caso, las células derivadas de FA-iPS mostraron una reubicación normal de FANCD2 (fig. suplementaria 10). Estos resultados, junto con la expresión persistente de FANCA en las células FA-iPS, demuestran claramente que las células iPS generadas partir de células somáticas portadoras de FA y genéticamente corregidas, mantienen completamente funcional la vía de FA y son por lo tanto fenotípicamente libres de enfermedad.

Nuestras conclusiones de que las células portadoras de FA solo se reprogramaban con éxito en los casos en los que habían sido transducidas con los lentivirus portadores de FANCA (a pesar de que solo el 35-50% de las células habían sido realmente transducidas con el lentivirus corrector; ver Fig. Suplementaria 9b), y que los transgenes lentivirales no habían sido completamente silenciados en las células FA-iPS, indican que una vía funcional de FA confiere una fuerte ventaja selectiva para la generación y/o el mantenimiento de las células iPS. Para demostrar esta posibilidad directamente, provocamos un knock down de la expresión transgénica de FANCA en las células FA-iPS mediante la infección lentiviral de FANCA short hairpin RNAs (shRNAs). De los cinco diferentes

shRNAs analizados, tres alcanzaron una depleción mayor del 70% de la expresión de FANCA en las células cFA404-KiPS4F3 (fig. 4c). En particular, las células iPS con los niveles más bajos de FANCA dejaron de proliferar después de un pase (fig. 4d).

Obtuvimos resultados similares con las células cFA90-44-14 (datos no mostrados). Mediante una aproximación complementaria, la depleción transitoria de la expresión de FANCA en las células FA-iPS-derivadas mediante la transfección de pequeños RNA de interferencia (siRNA) supuso una disminución marcada de la proliferación celular (aprox. 7 veces) comparada con las células transfectadas con scramble-siRNA (fig. 4e), y aún era más pronunciado (aprox. 15 veces) en respuesta al daño del DNA inducido por diepoxybutane (fig. 4e). Estos resultados proporcionan la evidencia adicional para el status de nuestras células FA•iPS libre de enfermedad y, revelan un papel previamente inesperado de la vía de FA como un aspecto crítico en el mantenimiento de la auto renovación de las células madre pluripotentes.

Progenitores hematopoyéticos libres de la enfermedad

Para analizar la capacidad de diferenciación a linajes hematopoyéticos de las células FA-iPS, los cuerpos embrioides de seis líneas diferentes (cFA90-44-11 y -44-14, cFA404-FiPS4F2, - KiPS4F1, - KiPS4F3 y - KiPS4F6) fueron co-cultivados con células estromales OP9³⁴ en presencia de citoquinas hematopoyéticas. En todos los casos, pudimos detectar células CD34+ mediante citometría de

flujo comenzando el día 5 y alcanzando su punto álgido el día 12 ($7.23 \pm 2.57\%$, n=7). Pudimos detectar asimismo células CD45⁺ en los cultivos del día 10, que alcanzaron $0.95 \pm 0.38\%$ (n=6) el día 12 (Fig. 5a). El momento de aparición y la frecuencia de los progenitores hematopoyéticos obtenidos de las células FA-iPS eran similares al de los obtenidos usando las células iPS de individuos sanos ($7.24 \pm 3.43\%$ de las células CD34⁺ en el día 12, n=5 de 2 líneas celulares iPS independientes) y de células madre embrionarias humanas ($6.62 \pm 1.03\%$ de células CD34⁺ en el día 12, n=5 de 2 líneas independientes de células madre embrionarias humanas; véase también la ref. 35).

Purificamos las células CD34⁺ obtenidas a partir de las FA-iPS el día 12 del protocolo de diferenciación en dos rondas de MACS (magneticactivated cell sorting) para analizar su capacidad de diferenciación hematopoyética en ensayos de progenitor clonogénico. Las células CD34⁺ obtenidas a partir de las FA-iPS generaron grandes colonias eritroides (Burst-forming unit-erithroid (BFU-E)) y mieloide (unidad formadora de colonia de granulocitos, monocitos (CFU-GM)) (fig. 5b, c). La naturaleza mieloide de las colonias CFU-GM fue confirmada por la expresión de los marcadores CD33 y CD45 en estas colonias (Fig. 5d). El potencial hematopoyético de las células CD34⁺ obtenidas a partir de las FA-iPS era sólido y los números de células formadoras de colonias (CFCs) obtenidos en análisis clonogénicos eran comparables a los obtenidos de las células CD34⁺ derivadas de células madre embrionarias humanas o de células iPS control (Fig. 5e, barras sólidas). Estos resultados indican que las células FA-iPS se diferenciaron con éxito en los progenitores hematopoyéticos de los linajes eritroides y mieloides.

Asimismo intentamos generar células sanguíneas en ratones NOD-SCID (nonobese diabetic/severe combined immunodeficient) trasplantados con células CD34⁺ obtenidas a partir de las FA-iPS, pero no se observó colonización de los precursores, coincidiendo con lo previamente descrito en cuanto a la limitación técnica para la recolonización de ratones inmunodeficientes con células madre embrionarias humanas diferenciadas *in vitro*³⁶.

Para analizar si los progenitores hematopoyéticos diferenciados de FA-iPS mantenían el fenotipo libre de enfermedad de las células FA-iPS, colonias hematopoyéticas fueron cultivadas en presencia de mitomicina C, porque la hipersensibilidad del DNA a los agentes crosslinking es una característica de las células de la FA 12. La proporción de colonias resistentes a la mitomicina C obtenidas de las células CD34⁺ obtenidas a partir de las FA-iPS era similar a la obtenida de las células mononucleares de médula ósea de donantes sanos, o de las células madre embrionarias humanas o de las células CD34⁺ obtenidas a partir de las FA-iPS control, y contrastó claramente con la hipersensibilidad a la mitomicina C demostrado por las células mononucleares de medula ósea de pacientes afectos para FA (fig. 5e, las barras blancas). Además, las células CD34⁺ obtenidas a partir de las FA-iPS podían formar focos nucleares después de la exposición a la mitomicina C (fig. 5f), demostrando una vía funcional de la FA.

Discusión

Antes de poder desarrollar el uso clínico de las estrategias basadas en iPS, es necesario resolver una serie

de limitaciones. A pesar de ser el método actualmente más eficiente para generar células iPS humanas, la transducción retroviral de células somáticas adultas con OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC da lugar a integraciones permanentes e indeseables de estos transgenes. Aunque estos transgenes se acaban silenciando durante el proceso de reprogramación, su reactivación durante la diferenciación celular (particularmente la del proto-oncogen c-MYC) ha sido asociada a la formación de tumores³⁷. Es posible generar células iPS humanas sin c-MYC, pero la eficiencia de reprogramación en este caso se reduce considerablemente^{27, 38}. Para comprobar si las células FA-iPS podían ser generadas sin c-MYC, utilizamos queratinocitos primarios del paciente FA404. Después de tres intentos de reprogramación, generamos una línea celular iPS (cFA404-KiPS3F1), que fue expandida de forma robusta y demostró poseer todas las características y la capacidad de diferenciación de las células iPS generadas con cuatro factores, y dio lugar a progenitores hematopoyéticos *in vitro* (Fig. suplementaria 11). Según lo esperado, el genoma de las células cFA404-KiPS3F1 no contenía las integraciones del retrovirus de c-MYC, como muestra la hibridación por Southern realizada con sondas específicas para los factores de reprogramación (Fig. suplementaria 12) y la PCR del DNA genómico (datos no mostrados). Estos resultados muestran que células iPS específicas de pacientes “más seguras” pueden ser generadas con tan solo tres factores, aunque con eficiencias que podrían ser no compatibles con su aplicación práctica. Además e idealmente, se debería evitar la modificación permanente del genoma de las células iPS, y omitir del todo la integración de los retrovirus. La reciente implementación de protocolos de reprogramación que no dependen de la integración viral³⁹

⁴², si su aplicabilidad a células humanas se confirmara, nos acercaría a esta posibilidad.

El uso de células iPS específicas del paciente para generar células corregidas libres de enfermedad podría superar potencialmente los riesgos de la oncogénesis insercional ⁴³ que actualmente es una de las limitaciones de las estrategias de terapia génica, ya que las células iPS corregidas genéticamente permiten la detección de los lugares seguros de integración de los transgenes terapéuticos. Además, se podría utilizar la recombinación homóloga ⁴⁴ para corregir los defectos genéticos de las células iPS específicas del paciente. Nuestros estudios revelan asimismo un papel crítico de la ruta de FA en la auto renovación de las células madre pluripotentes, que nosotros postulamos que proporciona una fuerte ventaja de selección de las células iPS que no han silenciado completamente el transgen terapéutico. Se debería considerar cuidadosamente la capacidad de las células madre humanas pluripotentes de silenciar los transgenes virales cuando se piense en el diseño de las futuras estrategias de terapia génica basadas en células iPS para las enfermedades en las que la corrección genética no confiere una ventaja de selección.

Resumen de los Métodos

Después de la aprobación por las autoridades competentes, se obtuvieron células somáticas de pacientes de FA. Los pacientes FA5, FA90 y FA153 fueron previamente descritos⁴⁵; los pacientes FA430 y FA431 corresponden a los pacientes 2 y 10, respectivamente, en la referencia 28. El paciente FA404 fue reclutado

recientemente para el estudio y clasificado según los métodos estándar⁴⁵. Las células somáticas fueron reprogramadas con los retrovirus de OCT4, SOX2 y KLF4, con o sin c-MYC (T58A), que contienen la secuencia Flag. Los vectores lentivirales para la terapia génica usados para corregir las células somáticas de FA fueron previamente descritos²⁶ y fueron preparados esencialmente como está descrito⁴⁶. La caracterización de las células iPS se realizó esencialmente como está descrito^{27,30}. La funcionalidad de la ruta de FA se evaluó mediante irradiación local de ultravioleta-C (UVC) esencialmente como está descrito³³. La diferenciación hematopoyética de las células iPS se realizó mediante co-cultivo de los cuerpos embrionarios sobre las células de estroma OP9³⁴ en presencia de BMP4, VEGF, ligando Kit, FGF2, TPO y ligando Flt. Para realizar el knock down de la expresión de FANCA, se empleó la transfección transiente de FANCA siRNA (ref. 47) como está descrito⁴⁸, con luciferasa siRNA como control, o mediante la liberación lentiviral de cinco FANCA shRNAs (Sigma, MISSION shRNA NM_000135) diferentes, usando shRNA aleatorio como control.

Figura 1 | Derivación de las células madre pluripotentes inducidas específicas de pacientes con anemia de Fanconi. a-f, Reprogramación exitosa de los fibroblastos cutáneos primarios genéticamente corregidos (a) derivados del paciente FA90. b, Colonia de células iPS de la línea cFA90-44-14 crecida en placas con Matrigel mostrando morfología de tipo célula madre embrionaria humana. c-f, La misma línea celular iPS muestra tinción fuerte para la fosfatasa alcalina (c) y expresión de los factores de transcripción OCT4 (d), SOX2 (e) y NANOG (f)

y los marcadores superficiales SSEA3 (d, e) y SSEA4 (f). g, Fibroblastos genéticamente corregidos del paciente FA404. h, Colonia de células iPS de la línea cFA404-FiPS4F1 crecida sobre células de soporte mostrando la morfología típica de célula madre embrionaria humana. I-L, La misma línea celular iPS muestra tinción fuerte para la fosfatasa alcalina (i) y la expresión de los factores de transcripción asociados a la pluripotencia OCT4 (j), SOX2 (k) y NANOG (l) y los marcadores superficiales SSEA3 (j), SSEA4 (k) y TRA1-80 (l). Los núcleos celulares se contratiñeron con 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) en d-f y j-l. Barras de escala, 100 μ m (a, c-g, I-L) y 250 μ m (b, h).

Figura 2 | Caracterización molecular de las líneas celulares FA-iPS. a, PCR de ADN genómico para detectar la integración de los transgenes retrovirales indicados en las líneas celulares FA-iPS cFA90-44-14 (cFA90) y cFA404-FiPS4F1 (cFA404). Se utilizaron los fibroblastos genéticamente corregidos (Fibr.) del paciente FA404 antes de la reprogramación como un control negativo. b, c, PCR cuantitativa con los análisis de transcripción reversa (RT-PCR) de los niveles de expresión de los factores de reprogramación derivados de retrovirus (b) y de los niveles de expresión total de los factores de reprogramación y los factores de transcripción asociados a la pluripotencia (c) en los fibroblastos (fibr.) de los pacientes indicados y en las líneas celulares FA-iPS. Las células madre embrionarias humanas (ES [4]) y las células iPS parcialmente silenciadas (KiPS4F3) se incluyen como controles. Se representan los niveles de expresión de los transcritos relativos a la expresión de GAPDH. d-g, Colonia de células iPS cFA90-44-14 mostrando altos niveles de expresión endógena de NANOG (e, canal verde

en d) y ausencia de inmunoreactividad contra Flag (f, canal rojo en d). Los núcleos celulares fueron contrateñidos con DAPI (g, canal azul en d). h, Secuenciación genómica por bisulfito de los promotores de OCT4 y de NANOG mostrando demetilación en las líneas celulares FA-iPS cFA90-44-14 y cFA404-KiPS4F3, comparado con los fibroblastos del paciente. Los círculos cerrados y abiertos representan CpGs metiladas y no metiladas, respectivamente, en las posiciones indicadas del promotor. Barra de escala, 100 μ m.

Figura 3 | Pluripotencialidad de las células FA-iPS.
a-c, Experimentos de diferenciación in vitro de las células cFA404-FiPS4F2 iPS revelan su potencial para generar los derivados celulares de las tres capas germinales celulares principales. Los análisis de inmunofluorescencia demuestran la expresión de los marcadores de a, endodermo (\bullet -fetoproteína, verde; FOXA2, rojo), b, neuroectodermo (TuJ1, verde; GFAP, rojo), y, c, mesodermo (\bullet -actinin, rojo). **d-f,** La inyección de células iPS cFA90-44-14 en los testículos de ratones inmunodeprimidos dan lugar a la formación de teratomas que contienen estructuras que representan a las tres capas germinales embrionarias principales. Derivados del endodermo (d, e) incluyen estructuras glandulares que dan positivo para marcadores de endodermo (\bullet -fetoproteína, verde); derivados del ectodermo (e) incluyen las estructuras que manchan positivo los marcadores neuroectodermos (TuJ1, rojo); derivados del mesodermo (f) incluyen estructuras que dan positivo para marcadores musculares (\bullet -actinin, rojo). Todas las imágenes son del mismo tumor. Barras de escala, 100 μ m. (a, b, d, e) y 25 μ m (c, f).

Figura 4 | Secuencia funcional de FA en las células FA-iPS. **a**, Análisis por Western blot de FANCA en los extractos proteicos de las líneas celulares indicadas, demostrando la expresión de FANCA en las células FA-iPS. Se utilizó la expresión de vinculina como control de carga. hES, ES humanas. **b**, FANCD2 (canal rojo) falla en reubicarse en las horquillas de replicación inducidas por radiación UVC, visualizada mediante inmunofluorescencia con anticuerpos contra los dímeros de la pirimidina del ciclobutano (CPD, canal verde), en fibroblastos del paciente FA404, mientras que muestra una acumulación normal en los sitios dañados en fibroblastos no enfermos (control), en fibroblastos corregidos (cFA404) o en células iPS derivadas de FA (cFA404-FiPS4F2). **c**, Análisis por Western blot de FANCA en los extractos proteicos de células no transducidas cFA404-KiPS4F3 ó 6 días después de la transducción con lentivirus expresando un shRNA inespecífico (control) o los shRNAs contra FANCA indicados. Se utilizó la expresión de vinculina como control de carga. Los valores en la parte inferior representan los niveles de expresión de FANCA medidos por cuantificación densitométrica normalizada para la expresión de vinculina y referida a células no transducidas cFA404-KiPS4F3. **d**, Tinción para la fosfatasa alcalina de células cFA404-KiPS4F3 un subclonaje después de ser transducidas con lentivirus expresando un shRNA inespecífico (control) o uno de los shRNAs contra FANCA indicados, una semana después de la siembra. **e**, Valores de índice mitótico en células derivadas de cFA404-FiPS4F2 transfectadas con siRNA inespecífico (control) o con siRNAs contra FANCA e incubado en la ausencia o en presencia de diepoxibutano (DEB). La inserción muestra la depleción de FANCA inducida por los siRNAs contra FANCA en estos

experimentos, según visualizado por Western blot usando vinculina como control de carga. Se presentan los datos como promedio \pm s.d.

Figura 5 | Generación de progenitores hematopoiéticos libres de enfermedad de las líneas celulares FA-iPS. a, Expresión de los marcadores CD34 y CD45 en las células FA-iPS sujetas a diferenciación hematopoiética. b, c, Colonias eritroides (BFU-E) y mieloídes (CFU-GM) representativas generadas 14 días después de la incubación de las células iPS derivadas de CD34⁺ en cultivo semisólido. d, Se confirmó la naturaleza mieloide de las colonias CFU-GM por la co-expresión de los marcadores CD33 y CD45 en las colonias de CFU-GM. e, Número total de CFCs generadas en ausencia y en presencia de mitomicina C a 10nM (MMC) de células CD34⁺ derivadas de las líneas celulares FA-iPS indicadas. A modo de comparación, se realizaron también los análisis clonogénicos utilizando progenitores hematopoiéticos de donantes sanos (células purificadas de sangre de cordón umbilical CD34⁺ de dos donantes independientes, CB CD34⁺; y células de la médula óssea mononucleares, BM MNC), de un paciente con FA y de células CD34⁺ derivadas de células madre pluripotentes humanas control, incluyendo células madre embrionarias humanas ES[2] (hES) y células KiPS4F1 (kiPS). f, Análisis de inmunofluorescencia mostrando los focos FANCD2 en las células CD34⁺ derivadas de las líneas celulares FA-iPS (línea cFA90-44-14) tratadas con mitomicina C.

DISCURS DE CONTESTACIÓ
PER L'ACADEMÍC NUMERARI

EXCM. SR. DR JOQUIM GIRONELLA I COLL

Excmo. Sr. Presidente de la Academia,
Excmo. Sres. Académicos,
Dignas autoridades,
Señoras y Señores:

En primer lugar deseo dar las gracias al Excmo. Sr. Presidente por haberme designado para responder en nombre de esta Real Corporación al discurso de ingreso del Excmo. Sr. Juan Carlos Izpisúa Belmonte.

La sesión solemne para recibir y acoger a un nuevo Académico es siempre un acto importante. Personifica la voluntad de continuidad, a través del tiempo y de sostén, de esta Real Academia reforzando la energía intelectual por medio de la incorporación de nuevas personalidades como hoy acontece.

Nuestra Real Corporación, ha contado y cuenta con un brillante elenco de académicos en los diferentes ámbitos de la ciencia, que sin duda la entrada del nuevo académico enriquecerá y dará lustre a la Sección de Ciencias de la Salud de esta corporación.

En un mundo donde conocimiento y reconocimiento no van siempre cogidos de la mano es vivificante encontrarse con una personalidad como la del Dr. Juan Carlos Izpisúa que ha sabido tanto mirar a la vez a la ciencia como a la realidad desde la perspectiva formalista de la biomedicina.

El Dr. Juan Carlos Izpisúa nacido hace 49 años en Hellín (Albacete), es un entusiasta del fútbol y también un enamorado de la ciudad de Barcelona. Estudió en la universidad de Valencia, doctorándose posteriormente en bioquímica y farmacología en Bolonia.

Es un hombre comprometido en su tiempo y espacio y como excelente investigador inmune al desaliento. Su prestigio en el ámbito de la biología celular le ha hecho merecedor de un respeto y consideración por parte del mundo científico, ocupando puestos de máxima responsabilidad en instituciones y reuniones científicas.

Su actividad investigadora se ha desarrollado en el marco de una serie de proyectos de investigación en la célula madre y por ende en la medicina regenerativa. Sus diversas investigaciones sobre la biología celular han sido reconocidas como un grupo de investigación emergente de excelencia por la Generalitat de Catalunya tal como queda reflejado en su dirección del “Centre de medicina regenerativa de Barcelona” (CMRB).

Con su sólida trayectoria científica y conocedor de su responsabilidad el recipiendario ha hecho gala de cómo exponer sus conocimientos y experiencia, amparándose en una sólida formación teórica y técnica, materializándose como tal en su denso curriculum vitae.

Actualmente ocupa el cargo de Profesor en Salk Institute de San Diego, California que compagina con el de Director del CMRB. Ha ocupado puestos de profesor y ha sido invitado en numerosos seminarios, catedras, cursos y también organizador de congresos internacionales, siendo el último en julio de este año en Barcelona. Múltiples honores y reconocimientos científicos conforman su dilatada e intensa actividad científica. Su nombre figura en más de 150 trabajos al lado de los más prestigiosos científicos en la materia. Su reconocimiento internacional es indiscutible.

"Un grupo de científicos ha logrado uno de los hitos más esperados de la biología moderna: aislar, a partir de embriones humanos, un tipo primitivo de célula que puede convertirse en cualquier tipo de tejido. Desde músculos, huesos o cerebro". Así comenzaba una de las crónicas periodísticas que se hacía eco del descubrimiento, el 6 de noviembre de 1998, de las células madre embrionarias.

El diario *The Washington Post* decía que se habían hallado las minas de oro de la biotecnología, y apostaba para que el nuevo material permitiera a los científicos reemplazar en el futuro tejidos dañados en pacientes con varias enfermedades. "Neuronas para gente con Alzheimer ó células pancreáticas para diabéticos".

Doncs bé, aquesta predicció s`ha complert i s`ha anat fins i tot mes enllà en el CMRB i el Salk Institute de San Diego, on van esser els primers en poder oferir de curar una malaltia: l` anèmia de Fanconi amb cèl·lules mare no embrionàries també conegudes com cel.lules amb pluripotència induïda ó iPS.

Les persones, com la resta d'animals, plantes i la majoria de fongs, son organismes pluricel·lulars, on les cèl·lules que ens conformen son les elements vius mes simples, ó el que es el mateix, son les estructures mes simples amb vida pròpia. Es calcula que el cos d'una persona adulta està constituïda aproximadament per mes de 100 bilions de cèl·lules (bactèries a part) especialitzades en diferents tasques. Tanmateix, nosaltres ho percivim com un organisme únic i no com 100 bilions d'organismes treballant conjuntament.

D'aquest total de cèl·lules tenim uns 250 tipus cel·lulars diferents, cèl·lules de la pell, musculars.... que experimenten unes 50 divisions i moren. Amb aquesta evidència, per tant, es pot afirmar que no existeix l'immortalitat cel·lular. Afirmació avui en dia molt agosarada. En efecte, tal com es van ens va assenyalar el propi Dr. Izpisúa, se sap molt bé que un tipus de cèl·lules sexuals, probablement mònades del nostre esser i precursores dels gàmets com son els espermatogonis, poden ser eterns. Aquestes cèl·lules precursores del espermatozou humà situades en el testicle son sempre les mateixes i, no mes moren quan nosaltres el continent morim. Aquests, els espermatogonis, situats en un cultiu específic i adequadament nodrits seguirien vius "eternament", fora del nostre cos, malgrat el vertigen existencial que aquestes paraules ens transmeten.

Es a partir d'aquí on inicialment, amb les coneudes controvèrsies ètiques, es varen utilitzar cèl·lules embrionàries per esser preprogramades genèticament a fi i efecte d'obtenir un nou teixit que permeti substituir el danyat.

El gran mèrit del Dr. Juan Carlos Izpisúa es la inversió del procés, d'anar a l'altre costat de les coses. Es a dir, utilitzar cèl·lules adultes no embrionària (iPS) del propi pacient, com poden esser les del cabell, i preprogramar-les mitjançant la utilització d'un plasmidi com a vector que es introduït en el nucli de la cèl·lula adulta. Assoleix així, dit d'una manera entenedora, dotar genèticament a la cèl·lula adulta de les característiques pròpies de les cèl·lules embrionàries.

Històricament, la investigació en teràpia gènica es varia iniciar a mitjans del 1980. Va créixer exponencialment durant la dècada de 1990; en aquells anys era la curació potencial per tot tipus de dolença. Vers l'any 2000 havien 400 assajos en marxa.

Encara que va haver-hi progressos alguns d'aquests assajos es varen rebutjats per l'aparició de greus efectes secundaris. De tot això es va extreure que la precipitació en traslladar a la clínica la teràpia gènica es devia entre altres factors a la idea preconcebuda en el nostre subconscient de que aquesta devia forçosament de funcionar.

Quant Barak Obama derogà el 9 de març les restriccions sobre els fons federals per investigar amb cèl·lules mare embrionàries (CME), no va oblidar en remarcar possibles falses expectatives afirmant: "No deberia sobreestimar-se la repercussió d'aquests treballs. No puc garantir que trobarem les teràpies que busquem".

Amb aquestes paraules es posava de manifest la preocupació i necessitat d'actuar amb prudència i, d'adequar la legislació a una realitat biològica indiscutible

on la naturalesa no actua per càstig ó recompensa sinó per conseqüències difícils de preveure.

Una naturalesa clarament no lineal, sempre exigent que es manifesta també en forma de malaltia i de dolor i que ha marcat al llarg dels segles de manera implacable l'esperit humà. Així, ens ho recordà el satíric i aristofanesc poeta Heinrich Heine amb la seva reflexió: "la vida es una malaltia; el mon un gran hospital; i la mort , el metge que ens cuida a tots "

Es evident que els estudis sobre les CME i les seves homologues no embrionàries augmentaran amb tota probabilitat la nostre comprensió de la diferenciació cel·lular, el desenvolupament humà i els defectes congènits. Amb sort també serviran per trobar nous tractaments (com el recent cas de corregir deformitats del rostre humà amb cèl·lules mare adultes realitzat per primera vegada en Europa al Hospital de la Vall d`Hebrò de Barcelona), i amb l`ajuda de mes fons i amb una ètica compatible amb la ciència es podrà explorar un camp tant interessant com esperançador.

Malgrat tot aviu en dia la nostre comprensió de la biologia de les CME i de les iPS es limitada en quant a seguretat i utilitat clínica. Podríem dir, que no mes amb una alta dosi d`humilitat i un dur treball amb la investigació bàsica ferant que els esforços mereixen la pena y que la medicina regenerativa sigui una realitat clínica en la pràctica diària ajudant que la existència sigui mes suportable. La privilegiada distància del temps ens ho dirà.

Estem convençuts que investigadors com el Dr. Juan Carlos Izpisúa segueixen el fil d'aquestes inquietuds manifestades, com així ho demostren les seves investigacions i el equi de magnífics professionals en que s`ha rodejat en els laboratoris de Sant Diego i Barcelona.

Es avui per nosaltres un dia important. Ens hem enriquit amb l'ingrés d'un nou i brillant Acadèmic. D'un home d'acció, de un científic de altíssim nivell i sobre tot d'un home que s`ha proposat de que la vida no sigui una malaltia sinó una esperança.

La enhorabona al Dr. Juan Carlos Izpisúa i a la Reial Acadèmia de Doctors.

Dr. Joaquim Gironella Coll

NOVES PUBLICACIONS DE LA REIAL ACADÈMIA DE DOCTORS

Directori 1991

Los tejidos tradicionales en las poblaciones pirineas (Discurs de promoció a acadèmic numerari de l'Excm. Sr. Eduardo de Aysa Satué, Doctor en Ciències Econòmiques, i contestació per l'Excm. Sr. Josep A. Plana i Castellví, Doctor en Geografia i Història) 1992.

La tradición jurídica catalana (Conferència magistral de l'acadèmic de número Excm. Sr. Josep Joan Pintó i Ruiz, Doctor en Dret, en la Solemne Sessió d'Apertura de Curs 1992-1993, que fou presidida per SS.MM. el Rei Joan Carles I i la Reina Sofia) 1992.

La identidad étnica (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Ángel Aguirre Baután, Doctor en Filosofia i Lletres, i contestació per l'Excm. Sr. Josep Ma. Pou d'Avilés, Doctor en Dret) 1993.

Els laboratoris d'assaig i el mercat interior; Importància i nova concepció (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Pere Miró i Plans, Doctor en Ciències Químiques, i contestació per l'Excm. Sr. Josep Ma. Simón i Tor, Doctor en Medicina i Cirurgia) 1993.

Contribución al estudio de las Bacteriemias (Discurs d'ingrés de l'acadèmic corresponent Il·lm. Sr. Miquel Marí i Tur, Doctor en Farmàcia, i contestació per l'Excm. Sr. Manuel Subirana i Cantarell, Doctor en Medicina i Cirurgia) 1993.

Realitat i futur del tractament de la hipertròfia benigna de pròstata (Discurs de promoció a acadèmic numerari de l'Excm. Sr. Joaquim Gironella i Coll, Doctor en Medicina i Cirurgia i contestació per l'Excm. Sr. Albert Casellas i Condom, Doctor en Medicina i Cirurgia i President del Col·legi de Metges de Girona) 1994.

La seguridad jurídica en nuestro tiempo. ¿Mito o realidad? (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. José Méndez Pérez, Doctor en Dret, i contestació per l'Excm. Sr. Ángel Aguirre Baután, Doctor en Filosofia i Lletres) 1994.

La transició demogràfica a Catalunya i a Balears (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Tomàs Vidal i Bendito, Doctor en Filosofia i Lletres, i contestació per l'Excm. Sr. Josep Ferrer i Bernard, Doctor en Psicologia) 1994.

L'art d'ensenyar i d'aprendre (Discurs de promoció a acadèmic numerari de l'Excm. Sr. Pau Umbert i Millet, Doctor en Medicina i Cirurgia, i contestació per l'Excm. Sr. Agustín Luna Serrano, Doctor en Dret) 1995.

Sessió necrològica en record de l'Excm. Sr. Lluís Dolcet i Boxeres, Doctor en Medicina i Cirurgia i Degà-emèrit de la Reial Acadèmia de Doctors, que morí el 21 de gener de 1994. Enaltiren la seva personalitat els acadèmics de número Excms. Srs. Drs. Ricard Garcia i Vallès, Josep Ma. Simón i Tor i Albert Casellas i Condom. 1995.

La Unió Europea com a creació del geni polític d'Europa (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Jordi Garcia-Petit i Pàmies, Doctor en Dret, i contestació per l'Excm. Sr. Josep Llort i Brull, Doctor en Ciències Econòmiques) 1995.

La explosión innovadora de los mercados financieros (Discurs d'ingrés de l'acadèmic corresponent Il·lm. Sr. Emilio Soldevilla García, Doctor en Ciències Econòmiques i Empresarials, i contestació per l'Excm. Sr. José Méndez Pérez, Doctor en Dret) 1995.

La cultura com a part integrant de l'Olimpisme (Discurs d'ingrés com a acadèmic d'Honor de l'Excm. Sr. Joan Antoni Samaranch i Torelló, Marquès de Samaranch, i contestació per l'Excm. Sr. Jaume Gil Aluja, Doctor en Ciències Econòmiques) 1995.

Medicina i Tecnologia en el context històric (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Felip Albert Cid i Rafael, Doctor en Medicina i Cirurgia, i contestació per l'Excm. Sr. Àngel Aguirre Baután) 1995.

Els sòlids platònics (Discurs d'ingrés de l'acadèmica numerària Excm. Sra. Pilar Bayer i Isant, Doctora en Matemàtiques, i contestació per l'Excm. Sr. Ricard Garcia i Vallès, Doctor en Dret) 1996.

La normalització en Bioquímica Clínica (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Xavier Fuentes i Arderiu, Doctor en Farmàcia, i contestació per l'Excm. Sr. Tomàs Vidal i Bendito, Doctor en Geografia) 1996.

L'entropia en dos finals de segle (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. David Jou i Mirabent, Doctor en Ciències Físiques, i contestació per l'Excm. Sr. Pere Miró i Plans, Doctor en Ciències Químiques) 1996.

Vida i música (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Carles Ballús i Pascual, Doctor en Medicina i Cirurgia, i contestació per l'Excm. Sr. Josep Ma. Espadaler i Medina, Doctor en Medicina i Cirurgia) 1996.

La diferencia entre los pueblos (Discurs d'ingrés de l'acadèmic corresponent Il·lm. Sr. Sebastià Trías Mercant, Doctor en Filosofia i Lletres, i contestació per l'Excm. Sr. Àngel Aguirre Baután, Doctor en Filosofia i Lletres) 1996.

L'aventura del pensament teològic (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Josep Gil i Ribas, Doctor en Teologia, i contestació per l'Excm. Sr. David Jou i Mirabent, Doctor en Ciències Físiques) 1996.

El derecho del siglo XXI (Discurs d'ingrés com a acadèmic d'Honor de l'Excm. Sr. Dr. Rafael Caldera, President de Venezuela, i contestació per l'Excm. Sr. Àngel Aguirre Baután, Doctor en Filosofia i Lletres) 1996.

L'ordre dels sistemes desordenats (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Josep Ma. Costa i Torres, Doctor en Ciències Químiques, i contestació per l'Excm. Sr. Joan Bassegoda i Novell, Doctor en Arquitectura) 1997.

Un clam per a l'ocupació (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Isidre Fainé i Casas, Doctor en Ciències Econòmiques, i contestació per l'Excm. Sr. Joan Bassegoda i Nonell, Doctor en Arquitectura) 1997.

Rosalía de Castro y Jacinto Verdaguer, visión comparada (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Jaime M. de Castro Fernández, Doctor en Dret, i contestació per l'Excm. Sr. Pau Umbert i Millet, Doctor en Medicina i Cirurgia) 1998.

La nueva estrategia internacional para el desarrollo (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Santiago Ripol i Carulla, Doctor en Dret, i contestació per l'Excm. Sr. Joaquim Gironella i Coll, Doctor en Medicina i Cirurgia) 1998.

El aura de los números (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Eugenio Oñate Ibáñez de Navarra, Doctor en Enginyeria de Camins, Canals i Ports, i contestació per l'Excm. Sr. David Jou i Mirabent, Doctor en Ciències Físiques) 1998.

Nova recerca en Ciències de la Salut a Catalunya (Discurs d'ingrés de l'acadèmica numerària Excm. Sra. Anna Maria Carmona i Cornet, Doctora en Farmàcia, i contestació per l'Excm. Josep Ma. Costa i Torres, Doctor en Ciències Químiques) 1999.

Dilemes dinàmics en l'àmbit social (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Albert Biayna i Mulet, Doctor en Ciències Econòmiques, i contestació per l'Excm. Sr. Josep Ma. Costa i Torres, Doctor en Ciències Químiques) 1999.

Mercats i competència: efectes de liberalització i la desregulació sobre l'eficàcia econòmica i el benestar (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Amadeu Petitbó i Juan, Doctor en Ciències Econòmiques, i contestació per l'Excm. Sr. Jaime M. de Castro Fernández, Doctor en Dret) 1999.

Epidemias de asma en Barcelona por inhalación de polvo de soja (Discurs d'ingrés de l'acadèmica numerària Excm. Sra. Ma. José Rodrigo Anoro, Doctora en Medicina, i contestació per l'Excm. Sr. Josep Llort i Brull, Doctor en Ciències Econòmiques) 1999.

Hacia una evaluación de la actividad cotidiana y su contexto: ¿Presente o futuro para la metodología? (Discurs d'ingrés de l'acadèmica numerària Excm. Sra. Maria Teresa Anguera Argilaga, Doctora en Filosofia i Lletres (Psicologia) i contestació per l'Excm. Sr. Josep A. Plana i Castellví, Doctor en Geografia i Història) 1999.

Directori 2000

Génesis de una teoría de la incertidumbre. Acte d'imposició de la Gran Creu de l'Orde d'Alfons X el Savi a l'Excm. Sr. Jaume Gil-Aluja, Doctor en Ciències Econòmiques i Financeres) 2000.

Antonio de Capmany: el primer historiador moderno del Derecho Mercantil (discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Xabier Añoveros Trías de Bes, Doctor en Dret, i contestació per l'Excm. Sr. Santiago Dexeus i Trías de Bes, Doctor en Medicina i Cirurgia) 2000.

La medicina de la calidad de vida (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Luís Rojas Marcos, Doctor en Psicologia, i contestació per l'Excm. Sr. Ángel Aguirre Baután, Doctor en psicologia) 2000.

Pour une science touristique: la tourismologie (Discurs d'ingrés de l'acadèmic corresponent Il·lm. Sr. Jean-Michel Hoerner, Doctor en Lletres i President de la Universitat de Perpinyà, i contestació per l'Excm. Sr. Jaume Gil-Aluja, Doctor en Ciències Econòmiques) 2000.

Virus, virus entèrics, virus de l'hepatitis A (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Albert Bosch i Navarro, Doctor en Ciències Biològiques, i contestació per l'Excm. Sr. Pere Costa i Batllori, Doctor en Veterinària) 2000.

Mobilitat urbana, medi ambient i automòbil. Un desafiament tecnològic permanent (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Pere de Esteban Altirriba, Doctor en Enginyeria Industrial, i contestació per l'Excm. Sr. Carlos Dante Heredia García, Doctor en Medicina i Cirurgia) 2001.

El rei, el burgès i el cronista: una història barcelonina del segle XIII (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. José Enrique Ruiz-Domènec, Doctor en Història, i contestació per l'Excm. Sr. Felip Albert Cid i Rafael, Doctor en Medicina i Cirurgia) 2001.

La informació, un concepte clau per a la ciència contemporània (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Salvador Alsius i Clavera, Doctor en Ciències de la Informació, i contestació per l'Excm. Sr. Eugenio Oñate Ibáñez de Navarra, Doctor en Enginyeria de Camins, Canals i Ports) 2001.

La drogaaddicció com a procés psicobiològic (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Miquel Sánchez-Turet, Doctor en Ciències Biològiques, i contestació per l'Excm. Sr. Pedro de Esteban Altirriba, Doctor en Enginyeria Industrial) 2001.

Un univers turbulent (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Jordi Isern i Vilaboy, Doctor en Física, i contestació per l'Excm. Sra. Maria Teresa Anguera Argilaga, Doctora en Psicologia) 2002.

L'envelliment del cervell humà (Discurs de promoció a acadèmic numerari de l'Excm. Sr. Jordi Cervós i Navarro, Doctor en Medicina i Cirurgia, i contestació per l'Excm. Sr. Josep Ma. Pou d'Avilés, Doctor en Dret) 2002.

Les telecomunicacions en la societat de la informació (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Ángel Cardama Aznar, Doctor en Enginyeria de Telecomunicacions, i contestació per l'Excm. Sr. Eugenio Oñate Ibáñez de Navarra, Doctor en Enginyeria de Camins, Canals i Ports) 2002.

La veritat matemàtica (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Josep Pla i Carrera, doctor en Matemàtiques, i contestació per l'Excm. Sr. Josep Ma. Costa i Torres, Doctor en Ciències Químiques) 2003.

L'humanisme essencial de l'arquitectura moderna (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Helio Piñón i Pallarés, Doctor en Arquitectura, i contestació per l'Excm. Sr. Xabier Añoveros Trias de Bes, Doctor en Dret) 2003.

De l'economia política a l'economia constitucional (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Joan Francesc Corona i Ramon, Doctor en Ciències Econòmiques i Empresarials, i contestació per l'Excm. Sr. Xavier Iglesias i Guiu, Doctor en Medicina) 2003.

Temperància i empatia, factors de pau (Conferència dictada en el curs del cicle de la Cultura de la Pau per el Molt Honorable Senyor Jordi Pujol, President de la Generalitat de Catalunya, 2001) 2003.

Reflexions sobre resistència bacteriana als antibiòtics (Discurs d'ingrés de l'acadèmica numerària Excm. Sra. Ma. de los Angeles Calvo i Torras, Doctora en Farmàcia i Veterinària, i contestació per l'Excm. Sr. Pere Costa i Batllori, Doctor en Veterinària) 2003.

La transformación del negocio jurídico como consecuencia de las nuevas tecnologías de la información (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Rafael Mateu de Ros, Doctor en Dret, i contestació per l'Excm. Sr. Jaime Manuel de Castro Fernández, Doctor en Dret) 2004.

La gestión estratégica del inmovilizado (Discurs d'ingrés de l'acadèmica numeraria Excm. Sra. Anna Maria Gil Lafuente, Doctora en Ciències Econòmiques i Empresarials, i contestació per l'Excm. Sr. Josep J. Pintó i Ruiz, Doctor en Dret).

Los costes biológicos, sociales y económicos del envejecimiento cerebral (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Félix F. Cruz-Sánchez, Doctor en Medicina i Cirurgia, i contestació per l'Excm. Sr. Josep Pla i Carrera, Doctor en Matemàtiques) 2004.

El conocimiento glaciar de Sierra Nevada. De la descripción ilustrada del siglo XVIII a la explicación científica actual. (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numeri Excm. Sr. Antonio Gómez Ortiz, Doctor en Geografia, i contestació per l'acadèmica de número Excm. Sra. María Teresa Anguera Argilaga, Doctora en Filosofia i Lletres (Psicologia) 2004.

Los beneficios de la consolidación fiscal: una comparativa internacional (Discurs de recepció com a acadèmic d'Honor de l'Excm. Sr. Rodrigo de Rato y Figaredo, Director-Gerent del Fons Monetari Internacional. El seu padri d'investidura és l'acadèmic de número Excm. Sr. Jaime Manuel de Castro Fernández, Doctor en Dret) 2004.

Evolución histórica del trabajo de la mujer hasta nuestros días (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Eduardo Alemany Zaragoza, Doctor en Dret, i contestació per l'acadèmic de número Excm. Sr. Rafel Orozco i Delclós, Doctor en Medicina i Cirurgia) 2004.

Geotecnia: una ciencia para el comportamiento del terreno (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Antonio Gens Solé, Doctor en Enginyeria de Camins, Canals i Ports, i contestació per l'acadèmic de número Excm. Sr. Eugenio Oñate Ibáñez de Navarra, Doctor en Enginyeria de Camins, Canals i Ports) 2005.

Sessió acadèmica a Perpinyà, on actuen com a ponents: Excm. Sra. Anna Maria Gil Lafuente, Doctora en Ciències Econòmiques i Empresarials i Excm. Sr. Jaume Gil-Aluja, Doctor en Ciències Econòmiques i Empresarials: “*Nouvelles perspectives de la recherche scientifique en économie et gestion*”; Excm.. Sr. Rafel Orozco i Delcós, Doctor en Medicina i Cirurgia: “*L'impacte mèdic i social de les cèl·lules mare*”; Excm. Sra. Anna Maria Carmona i Cornet, Doctora en Farmàcia: “*Nouvelles stratégies oncologiques*”; Excm. Sr. Pere Costa i Batllori, Doctor en Veterinària: “*Les résistances bactériennes a les antibiotiques*”. 2005.

Los procesos de concentración empresarial en un mercado globalizado y la consideración del individuo (Discurs d'ingrés de l'acadèmic de número Excm. Sr. Fernando Casado Juan, Doctor en Ciències Econòmiques i Empresarials, i contestació de l'Excm. Sr. Josep Ma. Costa i Torres, Doctor en Ciències Químiques) 2005.

“Son nou de flors els rams li renc” (Discurs d'ingrés de l'acadèmic numerari Excm. Sr. Jaume Vallcorba Plana, Doctor en Filosofia i Lletres (Secció Filologia Hispànica), i contestació per l'acadèmic de número Excm. Sr. José Enrique Ruiz-Domènec, Doctor en Filosofia i Lletres) 2005.

Historia de la anestesia quirúrgica y aportación española más relevante (Discurs d'ingrés de l'acadèmic de número Excm. Sr. Vicente A. Gancedo Rodríguez, Doctor en Medicina i Cirurgia, i contestació per l'acadèmic de número Excm. Sr. Josep Llort i Brull, Doctor en Ciències Econòmiques i Empresarials) 2006.

El amor y el desamor en las parejas de hoy (Discurs d'ingrés de l'acadèmic de número Excm. Sr. Paulino Castells Cuixart, Doctor en Medicina i Cirurgia, i contestació per l'acadèmic de número Excm. Sr. Joan Trayter i Garcia, Doctor en Ciències Econòmiques i Empresarials) 2006.

El fenomen mundial de la deslocalització com a instrument de reestructuració empresarial (Discurs d'ingrés de l'acadèmic de número Excm. Sr. Alfredo Rocafort i Nicolau, Doctor en Ciències Econòmiques i Empresarials, i contestació per l'acadèmic de número Excm. Sr. Isidre Fainé i Casas, Doctor en Ciències Econòmiques i Empresarials) 2006.

Biomaterials per a dispositius implantables en l'organisme. Punt de trobada en la Historia de la Medicina i Cirurgia i de la Tecnologia dels Materials (Discurs d'ingrés de l'acadèmic de número Excm. Sr. Josep Anton Planell i Estany, Doctor en Ciències Físiques, i contestació per l'acadèmic de número Excm. Sr. Pere Costa i Batllori, Doctor en Veterinària) 2006.

La ciència a l'Enginyeria: El llegat de l'école polytechnique. (Discurs d'ingrés de l'acadèmic de número Excm. Sr. Xavier Oliver i Olivella, Doctor en Enginyeria de Camins, Canals i Ports, i contestació per l'acadèmic de número Excm. Sr. Josep Pla i Carrera, Doctor en Matemàtiques) 2006.

El voluntariat: Un model de mecenatge pel segle XXI. (Discurs d'ingrés de l'acadèmica de número Excm. Sra. Rosamarie Cammany Dorr, Doctora en Sociologia de la Salut, i contestació per l'Excm. Sra. Anna Maria Carmona i Cornet, Doctora en Farmàcia) 2007.

El factor religioso en el proceso de adhesión de Turquía a la Unión Europea. (Discurs d'ingrés de l'acadèmic de número Excm. Sr. Josep Maria Ferré i Martí, Doctor en Dret, i contestació per l'acadèmic de número Excm. Sr. Carlos Dante Heredia García, Doctor en Medicina i Cirurgia) 2007.

Coneixement i ètica: reflexions sobre filosofia i progrés de la propedèutica mèdica. (Discurs d'ingrés de l'acadèmic de número Excm. Sr. Màrius Petit i Guinovart, Doctor en Medicina i Cirurgia, i contestació per l'acadèmic de número Excm. Sr. Josep Gil i Ribas, Doctor en Teologia) 2007.

Problemàtica de la família ante el mundo actual. (Discurs d'ingrés de l'acadèmic honorari Excm. Sr. D. Gustavo José Noboa Bejarano, Doctor en Dret i contestació per l'acadèmic de número Excm. Sr. D. Paulino Castells Cuixart, Doctor en Medicina i Cirugia) 2007.

Alzheimer: Una aproximació als diferents aspectes de la malaltia. (Discurs d'ingrés de l'acadèmica honoraria Excm. Sra. Dra. Nuria Durany Pich, Doctora en Biologia i contestació per l'acadèmic de número Excm. Sr. D. Eugenio Oñate, Doctor-Enginyer de Camins, Canals i Ports) 2008.

Guillem de Guimerà, Frare de l'hospital,President de la Generalitat i gran Prior de Catalunya. (Discurs d'ingrés de l'acadèmic honorari Excm. Sr. D. Josep Maria Sans Travé, Doctor en Filosofia i Lletres i contestació per l'acadèmic de número Excm. Sr. D. José E. Ruiz Domènec, Doctor en Filosofia Medieval) 2008.

La empresa y el empresario en la historia del pensamiento económico. Hacia un nuevo paradigma en los mercados globalizados del siglo XXI. (Discurs d'ingrés de l'acadèmic corresponent Il·lm. Sr. D. Guillermo Sánchez Vilariño, Doctor Ciències Econòmiques i Financeres i contestació per l'acadèmic de número Excm. Sr. D. Jaume Gil Aluja, Doctor en Ciències Econòmiques i Financeres) 2008.

Incertesa i bioenginyeria (Sessió Acadèmica dels acadèmics corresponents (Excm. Sr. D. Joaquim Gironella i Coll, Doctor en Medicina i Cirurgia amb el Ponents Excm. Sr. Dr. Jaon Anton Planell Estany, Doctor en Ciències Físiques, Excm. Sr. Dra. Anna M. Gil Lafuente, Doctora en Ciències Econòmiques i Financeres i Il·lm. Sr. D. Humberto Villavicencio Mavrich, Doctor en Medicina i Cirurgia) 2008.

Modelo de predicción de “Enfermedades” de las Empresas a través de relaciones Fuzzy
(Discurs d'ingrés de l'acadèmic corresponent Excm.Sr.Antoni Terceño.Gómez, Doctor
en Ciències Econòmiques i contestació per l'acadèmic de número Excm.Sr.Dr Paulino
Castells, Doctor en Medicina) 2009

La Reial Acadèmia, bo i respectant com a criteri d'autor les opinions exposades en les seves publicacions, no se'n fa responsable ni solidària.

® Reial Acadèmia de Doctors
Impressió: Imprenta Baltasar 1861
Tels. 93 346 91 52 – 93 346 92 06
08030 Barcelona
Tiratge 350 exemplars

Dipòsit Legal: B-42.531-2009

REIAL ACADEMIA DE DOCTORS
-Publicacions-