

Células madre, reprogramación celular y medicina regenerativa: ¿Realidad o ciencia ficción?

Estimular la regeneración de los tejidos, ralentizar el envejecimiento, reparar las lesiones y los traumatismos o generar órganos en el laboratorio son algunas de las promesas de la medicina regenerativa para este siglo. Los progresos en múltiples disciplinas científicas, como la biomedicina, la computación, los biomateriales y el conocimiento del genoma humano anticipan avances sorprendentes en este campo. ¿Qué terapias hay disponibles a día de hoy y cuales llegarán en un futuro próximo? ¿Qué limitaciones hay que superar para aplicar el conocimiento adquirido en el laboratorio a la clínica? Disponer en el laboratorio de todos los tipos celulares humanos, valorar la eficiencia de fármacos en modelos celulares generados a partir de células pluripotentes obtenidas de pacientes con una determinada enfermedad o estudiar las etapas tempranas del desarrollo embrionario humano son algunas de las posibilidades que nos ofrecen hoy las células madre y que serán críticas para el avance de la biomedicina en este siglo.

1. Introducción

1.1. Generación, regeneración y plasticidad celular: *una revisión histórica*

Con la llegada del siglo XXI todavía no somos capaces de conducir coches voladores o de viajar a la luna para visitar un centro comercial, pero sí hemos conseguido avances significativos para alcanzar otros sueños que quizás no tengan un toque tan fantástico para las vidas de las personas. Probablemente el mejor ejemplo de los cambios que han experimentado nuestras vidas gracias a la tecnología sea el continuo e incluso abusivo uso de las redes de información, concretamente de Internet. Además, los avances tecnológicos no son los únicos resultados de la investigación de vanguardia. Y lo que es más importante, el prolífero momento que está viviendo el campo médico, así como el prometedor futuro que tenemos en nuestras manos, implica que algunas ideas tardan tiempo en desarrollarse; a veces son rápidamente aceptadas y otras veces tardan varios años en implantarse hasta conseguir romper un dogma científico. Sin duda, la ciencia dogmática es una parte profunda de nuestro conocimiento actual y quizás no hubiera sido posible soñar lo que soñamos sin la enorme influencia histórica que tuvieron los gobiernos, las políticas cambiantes y la religión en nuestras investigaciones. ¿Podría alguien imaginar trasladar el concepto de las células madre a Lamarck, Linnaeus o incluso Galileo? La idea ha estado siempre subyacente en la mente de no tan sólo los prominentes científicos de una era relativamente moderna, sino también de la impresionante época de los griegos, romanos y egipcios, en la que el conocimiento estaba en manos de filósofos y eruditos. En la mitología griega, Prometeo tuvo relación con el concepto de la regeneración y sus implicaciones. Encadenado a una roca en el Cáucaso, su hígado era comido cada noche por las águilas para regenerarse al día siguiente, lo que implica el concepto subyacente de su inmortalidad. De hecho, la ciencia tradicional se basaba en gran medida en la observación y en

los hallazgos fortuitos. Siendo la regeneración quizás una de las demostraciones más sorprendentes del poder de la naturaleza que uno puede observar, es fácil imaginar a nuestros antecesores hacerse la pregunta de si algunos animales eran capaces de regenerar sus miembros ¿por qué no los humanos? A principios del siglo XVIII, Rene-Antoine Ferchault de Reaumur realizó el primer trabajo científico sobre este tema mediante la demostración y la descripción de la regeneración de las extremidades y de las pinzas de los cangrejos de río. Bajo la influencia de este trabajo, Abraham Trembley siguió estudiando la regeneración con la observación de los pólipos. Su estudio demostró la capacidad regenerativa de los pólipos de agua dulce después de cortar continuamente el animal en pedazos. Su observación redundó en el descubrimiento de que los pólipos pueden regenerar individuos completos y formar pólipos de varias cabezas, llamados Hidra en honor al personaje mitológico. A finales de la década de 1760, el italiano Lazzaro Spallanzani centró sus estudios en la potencial regeneración de los vertebrados y de los invertebrados. Su obra, publicada en 1768, describe la regeneración de las colas, extremidades y mandíbulas de las salamandras. Asimismo discutió la capacidad de los renacuajos para regenerar sus colas, así como la capacidad de las babosas y de los caracoles para regenerar sus cuernos y sus cabezas. También confirmó las observaciones anteriores de Charles Bonnet sobre la capacidad regenerativa de las lombrices. Ciertamente, la regeneración fascinó, y sigue fascinando, a un gran número de filósofos, naturalistas y científicos; no obstante, no fue hasta hace relativamente poco que empezaron a entenderse las observaciones empíricas sobre los fundamentos de la biología celular y el potencial subyacente de las células madre.

1.2. El nacimiento de la investigación de las células madre

¿Qué son las células madre? Desde el punto de vista embriológico, las células madre son las células capaces de generar un organismo multicelular completo. Quizás el concepto en sí mismo podría interpretarse como sencillo y obvio

debido a la observación, pero costó más de 30 años definir realmente la identidad de las células madre y crear unas condiciones experimentales fiables para el nacimiento de la investigación de las células madre. En la evolución animal, el cigoto podría ser considerado la célula totipotente inicial. El cigoto, el óvulo fecundado, es capaz de generar todos los linajes celulares del embrión, del feto y del adulto, incluido el tejido extraembrionario. Por tanto, tiene sentido suponer que si una sola célula puede desarrollar un organismo completo, esta célula tiene la capacidad de generar todos los tejidos posibles. Además, la respuesta a la pregunta de la posible resistencia de una población de células pluripotentes autorrenovables ha sido vaga durante décadas. De hecho, el mejor ejemplo de la tradicional creencia de la diferenciación direccional en tejidos especializados es el paisaje de Waddington (Waddington, 1957). En esta situación jerárquica, la célula totipotente inicial pierde progresivamente su competencia a través de varios pasos consecutivos de especificación y diferenciación. Por consiguiente, el desarrollo escalonado implica la generación de células pluripotentes, capaces de generar todos los tejidos de un organismo adulto, de células multipotentes, con la capacidad de generar unos cuantos linajes celulares distintos pero no todos, y de células unipotentes, capaces de generar un solo tipo de células especializadas. En realidad, tanto el interés tradicional de los biólogos del desarrollo y de los filósofos de la regeneración, como el trabajo inicial sobre la identificación celular, fueron en cierto modo independientes entre sí. Aunque la regeneración propiamente dicha constituía una de las cuestiones humanas científicas más evidentes, el campo de las células madre no retomó estos estudios en sus inicios. De hecho, el campo de las células madre comparte más sus orígenes con el campo oncológico que con ningún otro tema de estudio científico. Actualmente, ninguno de estos campos son independientes y todos ellos comparten una estrecha relación en base a dos grandes propiedades, la capacidad para la auto-renovación y la habilidad para diferenciarse en un número de linajes celulares. Ahora combinemos la discusión anterior sobre el vago concepto de las células pluripotentes que se mantienen en el organismo adulto con las observaciones sobre la regeneración en los

vertebrados e invertebrados. En la ciencia contemporánea es en cierta manera “fácil” ver la relación y entender que si los animales son capaces de regenerar hasta cierto punto órganos o tejidos, debe haber una población de células potencialmente capaz de generar todos los diferentes tipos de células especializadas por lo que, por definición, el trabajo histórico sobre la regeneración contemplaba de hecho la actividad de las células madre. No obstante, las cosas no son tan fáciles como se pintan aquí, y es muy probable que el conocimiento actual discuta este concepto tan minimalista. En realidad, la capacidad de regenerar no implica solamente a un grupo endógeno de células residentes, las células madre, capaces de diferenciarse en un número de tejidos sino que también, tal como comentaremos posteriormente, puede producirse un número de procesos distintos. Estos procesos quedan perfectamente ilustrados en el paisaje de Waddington. Tal como hemos comentado antes, el paisaje describe cómo las “células madre” pierden su capacidad para diferenciarse en otro tejido; sin embargo, el hecho de los atajos transversales, concretamente de la conversión/transdiferenciación/transdeterminación de los linajes, ha sido descrito recientemente (Graf y Enver, 2009). Además, en determinadas circunstancias, las células diferenciadas pueden “revertir” su estado diferenciado y transformarlo en una situación en la que se consigue la proliferación celular y la capacidad de generar un número reducido de tipos celulares (Jopling et al., 2010). Una nueva mirada al pasado demuestra que estos conceptos no son quizás tan innovadores como creíamos. Thomas Hunt Morgan no tan solo fue un científico pragmático sino también un fantástico observador. Resulta llamativo que la capacidad para la observación de Morgan le permitiera “atrapar” el primer mutante de ojos blancos de la drosophila (mosca de la fruta) cuando esta entró volando por su ventana y la cruzó hasta obtener las cepas mutantes, lo que provocó la proyección de la genética a una carrera frenética que sentó las bases de la biología moderna. Además, la leyenda dice que la genética fue el “segundo amor” de Morgan después de la regeneración. De hecho, Morgan fue el primero en instaurar el término morfálaxis y epimorfosis para definir dos tipos distintos de regeneración: la que se produce a falta de una proliferación celular activa y la

que conlleva una proliferación celular masiva. Además, la regeneración parecía ser un problema imposible de resolver, lo que hizo que Morgan abandonara su interés en la regeneración y dedicara sus esfuerzos a resolver la cuestión “más fácil” de la herencia. Es posible que Morgan hubiera disfrutado e incluso hubiera arrojado una luz esclarecedora sobre los descubrimientos que se produjeron poco después de su muerte. En 1954, nueve años después de la muerte de Morgan, Stevens y Little describieron por primera vez la formación espontánea de teratomas testiculares en ratones endogámicos, así como la generación de estos tumores mediante el trasplante de células germinales primordiales y embriones tempranos, es decir, el trasplante de células pluripotentes (Stevens y Little, 1954). Poco tiempo después, el informe inicial de Stevens y Little se tradujo en la primera generación de estructuras 3D capaces de transferirse a un cultivo y la generación en 1959 de formas ascíticas que contenían cuerpos embrioides por parte de Pierce y Dixon (Pierce y Dixon, 1959). De cualquier manera, e inconscientemente, Pierce y Dixon describieron por primera vez una población de células capaces de autorenovarse, primer criterio básico para la definición de las células madre. Poco después, Pierce y otros demostraron la capacidad de diferenciación de los cuerpos embrioides en los cultivos (Pierce y Verney, 1961; Pierce et al., 1960). Por consiguiente, establecieron la segunda propiedad básica compartida por las células madre y las cancerígenas, la capacidad de diferenciarse en un número de diferentes linajes celulares. Teniendo en cuenta que el proceso de diferenciación era un completo misterio, pronto se reivindicó que su mecanismo podría ser parecido a la morfogénesis embrionaria. Posteriormente, Pierce y Kleinsmith describieron que las células individualizadas de los cuerpos embrioides eran capaces de generar un teratocarcinoma una vez inyectadas *in vivo* (Kleinsmith y Pierce, 1964). Este hallazgo sentó un precedente y demostró de una manera convincente la presencia de células pluripotentes en la masa del tumor. En consecuencia, las células derivadas del teratoma capaces de autorenovarse así como de diferenciarse en un número de tejidos distintos, recibieron el nombre de carcinoma embrionario (CE). En 1970, dos estudios independientes demostraron

la posibilidad de aislar y establecer cultivos celulares clónicos a partir de cuerpos embrioides (Kahan y Ephrussi, 1970; Rosenthal et al., 1970). La clonalidad propiamente dicha constituía la prueba del principio de que las células pluripotentes estaban presentes en el cuerpo embrioide y no en las poblaciones celulares previamente constituidas debido al hecho de que la totalidad del proceso podía producirse *in vitro*. La prueba definitiva de la pluripotencia fue el trasplante en animales y la subsiguiente formación de teratomas, una prueba que sigue empleándose en los estudios de reprogramación modernos para demostrar la pluripotencia, tal como se debatirá más adelante y en profundidad en este capítulo. Además de quedar demostrada en los cultivos clónicos, la pluripotencia se observó también como una tendencia general a la reducción de las zonas diferenciadas en cultivos tardíos. De hecho, estos estudios trascendentales se basaban en cultivos originalmente establecidos a partir de líneas tumorales que habían sido en gran parte transferidas. Consiguientemente, pronto se reivindicó que la capacidad de diferenciación de los cultivos clónicos dependía del número de transferencias y del tiempo en cultivo. Un hallazgo fortuito conllevó la implantación de co-cultivos en los que los fibroblastos de pollo irradiados eran utilizados como capa alimentadora (Martin y Evans, 1974). Resulta interesante que el uso de estos alimentadores desembocara en la clasificación de los dos tipos celulares distintos observados en el cultivo de los teratomas, las células con morfología epitelioide llamadas células "E", mientras que las células pequeñas y de rápida proliferación recibieron el nombre de células "C". Además, en aquella época no se sabía a ciencia cierta si las células E eran derivados celulares procedentes de la diferenciación de las células C o si, por otro lado, estas poblaciones distintas ya existían en la masa del teratoma. En 1975, Martin y Evans informaron de un hallazgo importante cuando describieron la posibilidad de inducir una diferenciación dirigida de los cuerpos embrioides formados *in vitro* (Martin y Evans, 1975a, 1975b). Resulta curioso que los autores expusieran en su trabajo varias cosas que siguen siendo perfectamente aceptadas hoy en día. De hecho, en la primera línea de su trabajo afirman: los teratocarcinomas de ratón son una alternativa útil a los embriones para el

estudio de la determinación celular de los mamíferos (el proceso por el cual las células multipotenciales se implican en una secuencia de desarrollo especial), así como para el estudio de la consiguiente diferenciación final". Martin y Evans no tan solo consiguieron establecer las condiciones de diferenciación para la generación de cuerpos embrioides *in vitro*, sino que también demostraron el uso de las capas alimentadoras para la generación de unas poblaciones homogéneas en contraposición a la mezcla de células E y C antes descrita, así como el mantenimiento de la viabilidad celular. En este trabajo trascendental, los cuerpos embrioides diferenciados *in vitro* fueron capaces de generar un número de tejidos distintos que incluían tipos de células presentes en las tres capas germinales tales como células musculares cardíacas y procesos neurológicos así como otros tipos celulares especializados. Además, los autores demostraron las diferencias morfológicas existentes cuando se indujeron células nulipotentes para formar estructuras 3D en comparación con las células de los teratomas. Observaron que las células nulipotentes carecían de una capa endodérmica, lo que redundaba en una capa exterior lisa y la incapacidad de diferenciarse en un derivado celular. De igual modo, los autores descubrieron una tendencia general de las células por diferenciarse una vez eliminados los alimentadores y que las células fueran alimentadas por el medio. En aquella misma época, un estudio independiente de Janet Rossant demostró la formación de una capa endodérmica extraembrionaria cuando se aislaban las células de la masa celular interna (MCI) del embrión de ratón (Rossant, 1975). Por tanto, los autores concluyeron que la diferenciación *in vitro* de las células del teratocarcinoma podría utilizarse para estudiar los casos de determinación y diferenciación de las células, y que la diferenciación de las células de CE sigue el desarrollo embrionario habitual (Martin y Evans, 1975). Además las células de CE procedían del teratocarcinoma y su malignidad era un hecho demostrado, por lo todavía quedaba por demostrar la diferenciación de las células de CE y su paralelismo con el desarrollo embrionario habitual. Tal como sucede habitualmente en la ciencia, no tardó en producirse la primera demostración del potencial de desarrollo de las células de CE. Varios estudios evaluaron la

capacidad de las células de la MCI de contribuir a la formación de animales quiméricos tras la transferencia de blastocistos, aunque estas células seguían procediendo de embriones normales y el único estudio que contemplaba la posibilidad de que las células del CE contribuyeran a la formación de animales quiméricos se basaba en los cuerpos embrioides generados *in vivo* con escaso éxito (Brinster, 1974). Dos estudios independientes publicados en 1975 aclararon posteriormente esta cuestión y demostraron la formación quimérica tras la inyección de células de CE, además de que los animales mostraron una predisposición a la formación de tumores tras el nacimiento o durante su vida (Papaioannou et al., 1975; Mintz e Illmensee, 1975). Y lo que es más importante, no se observó la contribución quimérica a la línea germinal, lo que descarta que las células de CE fueran totalmente idénticas a las células embrionarias. Ahí es donde quizás las células cancerígenas y las células madre empezaron a diferenciarse entre sí. Las células del CE eran células procedentes del teratocarcinoma capaces de formar tumores secundarios tras el trasplante, y por otra parte las células de CE mostraron un cariotipo anormal, una característica que podría explicar su nula contribución a la línea germinal de los animales quiméricos. De igual modo, a principios de la década de los 70 se extendió rápidamente la noción de que las células de CE eran enormemente parecidas a las células embrionarias tempranas. Una de las principales áreas que apoyaban esta noción fue el descubrimiento de unos antígenos superficiales específicos para las células primitivas de CE no diferenciadas. El trabajo realizado por Artzt y sus colaboradores publicado en 1973 ilustra y aborda perfectamente estas similitudes (Artzt et al., 1973). Los autores sometieron a prueba dos hipótesis subyacentes: en primer lugar, tal como explican elegantemente en su introducción, “cabe esperar que las células del embrión temprano posean determinados antígenos específicos implicados en el desarrollo que posteriormente desaparecen del organismo. Estos antígenos, por consiguiente, deberían evocar una respuesta inmunológica específica en el organismo adulto singénico”. Y en segundo lugar, “si las células PTC poseen estos condicionantes, la hiperinmunización del ratón adulto singénico debería

obtener la formación de anticuerpos que reaccionaran no tan solo con las células PTC, sino también con las células del embrión temprano”. Este planteamiento demostró una prueba de principio satisfactoria que, ciertamente, las células del teratocarcinoma no diferenciadas, definidas como Células del Teratocarcinoma Primitivo (PTC) por Artzt et al., expresan unos antígenos propios de la fase que comporta una respuesta inmunológica, es decir, la generación de antisueros que reconocen las moléculas superficiales. Los autores exploraron además la especificidad de los antisueros generados mediante la prueba de su reactividad con otras células de ratón, incluidas las células diferenciadas. De hecho, solo las células germinales masculinas (origen de la mayoría de los teratocarcinomas) y los embriones en fase de escisión reaccionaron ante los antisueros propios de las PTC. Por consiguiente, las células de CE presentaban unos marcadores de superficie de las células comunes con las células embrionarias y germinales que podían distinguirse de las poblaciones diferenciadas, un hecho que fue posteriormente corroborado y divulgado por otros varios grupos. Al cabo de unos años, el creciente número de marcadores de superficie de células de CE comúnmente identificados con las células embrionarias permitió la percepción generalizada de que las células de CE eran en realidad muy parecidas a las células de la MCI del embrión. Teniendo en cuenta estas similitudes, no se tardó mucho en dilucidar el origen real de los teratocarcinomas, y por consiguiente, de las células de CE. Se constató que los teratocarcinomas procedían de células no malignas normales, una observación que planteó la posibilidad de cultivar células pluripotentes sin la etapa de formación de tumores (Evans, 1981). Dos estudios independientes describieron la generación de líneas pluripotentes mediante el aislamiento de las células embrionarias (Evans y Amufan, 1981; Martin, 1981). Cabe destacar el interés, aunque el artículo de Amufan et al fue publicado antes en Nature, del trabajo de Gail Martin, que con el uso de los medios condicionados por células de CE, fue el primero en referirse a estas células pluripotentes como Células Madre Embrionarias (ES). Estas células presentan todas las características anteriormente observadas de las células de CE y demostraron su capacidad para la diferenciación. Además, las líneas

pluripotentes generadas poseían un cariotipo normal. Teniendo en cuenta que las células de CE que poseían un cariotipo anómalo eran incapaces de contribuir a la línea germinal, es decir impedían la manipulación genética, la generación de líneas pluripotentes sin anomalías genéticas abría la posibilidad de generar animales quiméricos a través del quimerismo en la línea germinal. Tuvieron que pasar unos tres años hasta que Bradley y sus colaboradores describieron por primera vez la brillante generación de animales quiméricos a través de la línea germinal (Bradley et al., 1984), un informe respaldado por una actividad intensa debido a sus implicaciones y sus posibilidades supuestamente infinitas. La generación de animales quiméricos a través de la línea germinal implica la posibilidad de la manipulación genética de los animales, lo que permite la creación de animales transgénicos así como la inducción de mutaciones aleatorias. Los vectores retrovirales fueron la opción elegida para estos primeros estudios sobre la manipulación genética (Robertson et al., 1986). La ingeniería genética en el contexto de un sistema celular tras las fases de desarrollo *in vitro* habituales, así como la capacidad de generar animales transgénicos, abrió la posibilidad de modelar enfermedades mediante con medios sencillos. Por consiguiente, rápidamente se aceptaron las células ES como alternativa al escaso material disponible durante el desarrollo normal del embrión así como sus cambios temporales. Por otra parte, el cultivo *in vitro* de las células ES actúa de depósito eterno para las células pluripotentes, que de este modo pueden ser posteriormente inducidas en las células diferenciadas en el momento en que el investigador lo considere oportuno. Pese a que el rápido avance conseguido en el sistema del ratón sirvió para establecer la noción de las células ES como células pluripotentes capaces de propagarse *in vitro* durante un tiempo ilimitado y un sistema perfecto para el estudio del desarrollo, el hecho fue que las poderosas cuestiones éticas y la escasa cantidad de material obstaculizaron su traslación directa al sistema humano. Sin embargo, son varios los informes que describieron la generación de líneas pluripotentes procedentes de primates no humanos como alternativa a la destrucción de embriones humanos para la generación de líneas de células ES (Thomson et al., 1995).

Además, el criterio básico utilizado para la diferenciación de las células de CE de las células ES, es decir la contribución de las células pluripotentes a la línea germinal en los animales quiméricos, fue un fuerte impedimento para la generación y la caracterización de las líneas pluripotentes humanas. No fue hasta 1998 que apareció la primera descripción de la generación de las líneas de células madre procedentes de blastocistos humanos (Thomson et al., 1998). En este informe histórico publicado en Science, Thomson y sus colaboradores establecieron los criterios básicos para la caracterización de las líneas pluripotentes humanas a falta de humanos quiméricos por razones éticas y prácticas. Sin embargo, siguen aplicándose los criterios establecidos por Thomson y que consisten en tres características básicas de la pluripotencia: 1) la derivación de las células de un embrión preimplantación o periimplantación, 2) la proliferación prolongada no diferenciada y 3) la capacidad de diferenciarse en derivadas de las tres capas germinales *in vitro*, incluso después de un cultivo prolongado. Los autores de este trabajo utilizaron embriones humanos en fase de escisión obtenidos mediante fertilización *in vitro* y aislaron las CMI tras el cultivo. Las células aisladas eran comparables a otras líneas de ES de primates no humanos previamente establecidas y cumplían todos los criterios preestablecidos para la pluripotencia. Cabe señalar el interés de este trabajo ya que demostró las diferencias según las especies en las líneas de ES pluripotentes, lo que permitió determinar que las células ES humanas son el método más fiable para el estudio del desarrollo humano en contraposición al sistema del ratón. Por consiguiente, todas las líneas generadas expresaron unos marcadores de pluripotencia tales como el SSEA3/4, el Tra1-60 y el Tra1-81 y decididamente marcaron la presencia de fosfatasa alcalina, al igual que en las células ES humanas. Además, tanto las células humanas de CE como las células ES humanas no expresaron el SSEA1, el primer marcador de células madre descrito en las células de ratón.

2. Las promesas de la pluripotencia

El hecho de que las células madre pluripotentes puedan dar origen a todo tipo de células de un organismo, junto con el avance técnico que permite su aislamiento, hace que evoque fantasías tales como la fuente de la eterna juventud y la regeneración eterna y constituya uno de los campos científicos más prometedores con implicaciones clínicas. En el siguiente subcapítulo ofreceremos un resumen de cuáles son las células pluripotentes, de los problemas relacionados con su aplicación y en qué manera contribuyen al desarrollo de la medicina en el futuro.

2.1. Conseguir la pluripotencia en una placa de Petri: *tecnología punta*

2.1.1 *Células del carcinoma embrionario:*

Los estudios realizados sobre las células madre pluripotentes encuentran sus raíces en la descripción de tumores, teratomas (benignos) y teratocarcinomas (malignos), compuestos por tejidos adultos caprichosamente dispuestos como los dientes, la piel, el pelo, los huesos, los músculos y otros más. El origen de estos “monstruos” (*teratos* en griego) fue revelado por la descripción de la capacidad de una célula de autorenovarse permanentemente mientras que sus células hijas se diferencian espontáneamente en diversos tipos de células. El estudio de estos tumores no tan solo contribuyeron a la identificación y el aislamiento de las células pluripotentes sino que también establecieron unas bases metodológicas sólidas para la investigación moderna de las células pluripotentes (véase el resumen histórico en **el nacimiento de la investigación de las células madre**). En los informes iniciales se derivaron clónicamente líneas de células de CE tanto de cuerpos embrioides, los conglomerados de células que se parecen a los embriones tempranos y que se encuentran en la conversión ascítica de estos tumores (Rosenthal et al., 1970; Kahan y Ephrussi, 1970) como de teratocarcinomas sólidos (Evans, 1972). Con su trabajo sobre las líneas de teratocarcinomas, Martin y Evans perfeccionaron los métodos que

permitían el cultivo de células madre pluripotentes, incluida la expansión de las células de carcinoma embrionario en la capa alimentadora de las células mitóticamente inactivas y la formación *in vitro* de cuerpos embrioides (Martin y Evans, 1974). En términos generales, los trabajos trascendentales sobre las células de CE murinas y humanas permitió el desarrollo de tecnologías que permitieron la derivación de las células diploides pluripotentes procedentes de los blastocistos.

2.1.2. Células madre embrionarias:

En la fase inicial de la vida, todos los individuos son unicelulares como consecuencia de la fusión de un gameto masculino y uno femenino. Dado que conservan la capacidad de generar tanto tejidos extraembrionarios como embrionarios, el óvulo fecundado y las primeras 4 células obtenidas por su división, son considerados como totipotentes, es decir capaces de generar un organismo completo. Con la continuación de su desarrollo mediante un proceso de división exponencial, en los humanos la fase de desarrollo de 64 células se alcanza a los 4-5 días siguientes a la fecundación; es la llamada fase de blastocistos. En esta fase se desarrolla una masa celular interna polarizada (MCI) y las células que forman la MCI poseen la capacidad de dar origen a cualquiera de las tres capas germinales que componen los tejidos humanos (endodermo, mesodermo y ectodermo). En 1981, Martin Evans y Matthew Kaufman informaron por primera vez del establecimiento en un cultivo de tejidos de líneas de células pluripotentes aisladas de cultivos *in vitro* de blastocistos de ratón (Evans y Kaufman, 1981). Tal como se ha mencionado antes, unos meses después, se acuñó el término “Células Madre Embrionarias” (ES) para estas células (Martin, 1981). Sin embargo, tuvieron que pasar 19 años para la publicación del primer informe sobre el aislamiento de las células ES humanas (hES) y que sentó los cimientos de una nueva y amplia área de investigación de las células madre pluripotentes humanas (Thomson et al., 1998). Posteriormente

se conocieron otros métodos de derivación de las células CEMH, y todos ellos exigían el mantenimiento en cultivo, hasta la fase de los blastocistos, de los embriones obtenidos por fecundación *in vitro*. La mayoría de estos métodos comprenden el aislamiento de las células de la MCI desde la capa exterior, es decir el trofoectodermo, mediante el uso de procedimientos inmuoquirúrgicos, químicos, mecánicos o asistidos por láser (Kim et al., 2005). Con carácter alternativo se utilizó un método de cultivo del embrión completo para establecer las células hES mediante la siembra del blastocisto entero sin su zona pelúcida. El denominador común de estas técnicas es que las células son después sembradas en células alimentadoras, generalmente una monocapa de fibroblastos embrionarios de ratón mitóticamente inactivos, o en placas recubiertas con proteínas de la matriz extracelular que toleran el crecimiento indiferenciado de células hES. Curiosamente, las propiedades de las células ES humanas no son idénticas a las de las células ES del ratón (Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998) pero, entre sus puntos en común, comparten una capacidad “indefinida” de auto-renovación a la vez que conservan su capacidad para diferenciarse en cualquier tipo de células del organismo.

Una alternativa al uso de los embriones obtenidos con las tecnologías de reproducción asistida para la derivación de las células ES consiste en la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) (Wilmut et al., 2002). Gracias a la oveja Dolly (Wilmut et al., 1997), esta técnica consiguió un enorme impacto entre el público. Una vez transferido a un ovocito enucleado, el núcleo de una célula somática es reprogramado por los factores citoplásmicos del óvulo para convertirlo en un óvulo fecundado. Por consiguiente, el óvulo puede desarrollar y alcanzar la fase de blastocisto, momento en el que puede procederse al aislamiento de las células ES y a su mantenimiento en cultivo. Un informe reciente de Noggle et al. ha demostrado que los ovocitos humanos pueden reprogramar las células somáticas a estado pluripotente (Noggle et al., 2011).

2.1.3 Células germinales embrionarias:

Las células germinales, en su forma final de gametos haploides (espermatozoides y óvulos), son el origen de la transmisión genética que inicia la generación de los organismos. Durante el desarrollo, las células germinales surgen de las células germinales primordiales (CGP) y tienen su origen en el epiblasto antes de asentarse en el reborde gonadal. Aunque las CGP aparecen en una fase de desarrollo más tardía que la de blastocisto, estas células recuerdan a las células ES. Cuando se colocan en unas condiciones de cultivo de células ES después de aislarlas del embrión de ratón (Matsui et al., 1992) o humano (Shamblott et al., 1998), las células germinales embrionarias /CGE) muestran las características típicas de la pluripotencia, incluida la capacidad de auto-renovación, la de generar las células de las tres capas germinales y la de formar cuerpos embrioides.

2.1.4 Células madre pluripotentes inducidas:

Teniendo en cuenta que el concepto de la TNCS evidenció la posibilidad de revertir los cambios que rigen la diferenciación, el primer informe sobre las células madre pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés) supuso un cambio radical en nuestra visión actual de las células pluripotentes. En el año 2006, Takahashi y Yamanaka desvelaron al mundo la capacidad de generar experimentalmente células madre pluripotentes de ratón (Takahashi y Yamanaka, 2006) y posteriormente humanas (Takahashi et al., 2007), sin la necesidad de utilizar material embrionario. Utilizando la estrategia de un embudo, sobreexpresaron en fibroblastos de ratón adulto 24 genes previamente identificados como elementos fundamentales para el mantenimiento de la pluripotencia en las células ES. Mediante la exploración de múltiples combinaciones y con un enfoque reduccionista, concluyeron la identificación de 4 factores de transcripción, concretamente el Oct3/4, el Sox2, el c-Myc y el Klf4,

lo que permitió la reversión de los fibroblastos de ratón adulto a un fenotipo celular parecido a la célula ES cuando eran mantenidos en unas condiciones de cultivo de células madre pluripotentes previamente establecidas (ver arriba). Este importante descubrimiento generó un entusiasmo increíble entre la comunidad científica. Posteriormente, el laboratorio Thomson señaló la posibilidad de reprogramar las células somáticas mediante la sustitución de dos “factores Yamanaka”, el c-Myc y el Klf4, por el Nanog y el Lin28 (Yu et al., 2007). A continuación, varios laboratorios indicaron la posibilidad de alcanzar la pluripotencia mediante el uso de 3 (Nakagawa et al., 2008), 2 (Giorgetti et al., 2009) e incluso solo uno de estos factores (Kim et al., 2009b), según el tipo de célula somática inicial. La observación de que el Oct4 es capaz por sí solo de revertir las células madre neuronales en una célula parecida a las ES (Kim et al., 2009b), reveló que el Oct4 es el factor de transcripción básico para la pluripotencia. Dado que los informes iniciales que describían la generación de células iPSC mediante enfoques integradores/basados en virus, incluido el uso de vectores mono y policistrónicos (Carey et al., 2009), los laboratorios de todo el mundo se lanzaron rápidamente a la carrera para desarrollar tecnologías alternativas para evitar la integración del ADN exógeno en el genoma del huésped. Hasta la fecha se han descrito varios métodos de reprogramación sin integración, entre otros: i) virus escindibles de la recombinasacra (Soldner et al., 2009); ii) adenovirus no integradores (Stadtfield et al., 2008); iii) plásmidos de expresión (Okita et al., 2008; Kaji et al., 2009); iv) transposones piggyBac (Woltjen et al., 2009); v) vectores episomales (Yu et al., 2009); vi) liberación de proteínas de reprogramación (Zhou et al., 2009; Kim et al., 2009); vii) liberación de ARN mensajeros (Warren et al., 2010). Últimamente se ha señalado la posibilidad de reprogramar las células somáticas mediante la sobreexpresión de un grupo específico de micro ARN (miR-302/367) (Anokye-Danso et al., 2011), lo que aumenta la posibilidad de desarrollar rápidamente otro método de reprogramación sin integración.

Aunque el número de enfoques de reprogramación crece continuamente y varias metodologías parecen haber superado las eficiencias iniciales y el tiempo necesario para la reprogramación, el hecho es que aunque son enormemente parecidas, las células ES y las células iPSC presentan varias diferencias (Phanstiel et al., 2011). Una comparación rigurosa de ambos tipos de células pluripotentes desembocó en la observación de que aunque la expresión génica global estaba enormemente correlacionada, podían observarse pequeñas diferencias en el ARN mensajero (Chin et al., 2009). Además se ha demostrado que el perfil epigenético de ambos tipos de células es distinto y se ha constatado la memoria epigenética, es decir la conservación de las marcas epigenéticas del tejido somático original, de las células iPSC (Kim et al., 2010; Polo et al., 2010).

2.2. El lado oscuro de las células madre pluripotentes: *la ralentización de las aplicaciones terapéuticas*

La verdad es que las células iPSC no son totalmente idénticas a las células ES. Sin embargo, los científicos están de acuerdo sobre el potencial de esta fuente de células pluripotentes a pesar de estas diferencias. De hecho, la historia de todas las células madre pluripotentes, y no tan solo de las iPSC, puede verse como una montaña rusa con sus subidas y bajadas, lo que refleja las dicotomías relacionadas con lo que define su identidad: su capacidad de auto-renovación y de diferenciación. Teniendo esto en cuenta, en los apartados siguientes discutiremos los motivos por los que, a pesar de la enorme esperanza que despierta su uso, las células madre pluripotentes siguen afrontando problemas que están retrasando su traslado al ámbito clínico.

2.2.1. Cuestiones éticas

Hasta hace poco, uno de los principales problemas relacionados con el uso de las células madre pluripotentes humanas era más de índole social que técnico.

La necesidad de material embrionario, y su consiguiente destrucción para el aislamiento de las células madre embrionarias (células ES y EGC), ha sido el origen de las disputas, tanto en los escenarios políticos como religiosos, así como entre los medios de comunicación y la propia comunidad científica. De igual modo, la capacidad de generar células pluripotentes mediante el uso de la tecnología TNCS ha despertado el miedo por la posibilidad de la clonación terapéutica, con la que eventualmente podrían utilizarse los clones humanos para curar al individuo “original”. Por este motivo en varios países se han promulgado leyes regulatorias estrictas relacionadas con el uso de las células ES embrionarias y derivadas de la TNCS. Actualmente, gracias al descubrimiento de la reprogramación de las células iPSC, esta preocupación parece haber disminuido y se están abriendo nuevos caminos para la aplicación de las células pluripotentes en el campo médico.

2.2.2. Riesgos de cáncer asociados con la pluripotencia

Las células EC son una buena introducción para la otra principal cuestión relacionada con el uso de las células pluripotentes. De hecho se ha relacionado la causalidad genética con la elevada incidencia de teratocarcinomas espontáneos en una cepa de ratón concreta (Stevens, 1973). Esta observación sugiere que las mutaciones genéticas podrían ser las responsables del mantenimiento de un estado pluripotente quiescente que posteriormente podría degenerar y comportar la formación de un tumor maligno. Además, el trabajo en el campo del cáncer ha demostrado que las mutaciones en un conjunto de genes en particular, por ejemplo los oncogenes y los genes supresores de tumores, pueden ser el origen de la formación de tumores. Teniendo esto en cuenta, a pesar de la esperanza que despierta el uso de las células madre pluripotentes en las aplicaciones terapéuticas, existen varios problemas graves de seguridad. Por consiguiente, el potencial tumorigénico relacionado con las células pluripotentes obstaculiza enormemente el traslado de los descubrimientos al ámbito clínico.

En 1995, la identificación de las alteraciones genómicas en células ES humanas cultivadas despertó una nueva preocupación en lo que se refiere al uso de las células pluripotentes y de sus derivados para fines clínicos (Maitra et al., 2005). En su estudio, Maitra y sus colaboradores demostraron que el mantenimiento en cultivo de células ES humanas comporta unas alteraciones genómicas habitualmente observadas en los cánceres humanos tales como la variación en el número de copias (CNV) y las modificaciones epigenéticas. Dichas observaciones han sugerido que la metodología de expansión clónica habitualmente utilizada para el mantenimiento en cultivo de las células pluripotentes proporciona un medio para la selección de mutantes que presenten unas características beneficiosas estrechamente relacionadas con las células cancerígenas. La hipótesis de la inestabilidad genómica inducida por el cultivo se vio confirmada por el trabajo de Allegrucci y sus colaboradores en el que demostraron que las líneas de células ES humanas heredan con el tiempo los cambios epigenéticos en el cultivo (Allegrucci et al., 2007). Y lo que es más importante, han demostrado que estas modificaciones epigenéticas aparecen generalmente poco después de la derivación, y por tanto apoyan la teoría de la selección beneficiosa. Hoy sabemos perfectamente que las células ES humanas comparten numerosos fenotipos celulares y moleculares con las células cancerígenas, tanto en su estado no transformado (diploidía) como tras su transformación en cultivo (aneuploidía) (Knoepfler, 2009; Blum y Benvenisty, 2009, 2008). Lamentablemente, las células iPSC no son la excepción que hace la regla. De hecho, la edad de oro de las células iPSC se vio recientemente alterada cuando una serie de estudios, que utilizaban un amplio espectro de herramientas genómicas como la secuenciación de exomas y las variedades de polimorfismo de nucleótido simple (SNP), demostraron que las células iPSC soportan mutaciones no existentes en las células somáticas iniciales (Gore et al., 2011). Cabe señalar que el laboratorio Zhang identificó, entre 22 líneas de células iPSC analizadas, una media de mutaciones en 5 puntos en las regiones de codificación de las proteínas. Más preocupante es el hecho de que la mayoría de estas mutaciones ($\approx 50\%$) se identificaron en los genes relacionados con el

cáncer. Y lo que es más importante, este estudio descartó la posibilidad de que las mutaciones observadas se debieran a las estrategias integradoras de reprogramación. De hecho, Gore et al. observaron un patrón parecido de mutaciones en las células iPSC generadas tanto con enfoques de reprogramación virales (retrovirus/lentivirus) como no virales (ARN mensajero, vector episomal). De igual modo, el laboratorio Loring demostró que puede observarse una mayor frecuencia de CNV en las células ES humanas y en las células iPSC humanas (Laurent et al., 2011). Resulta interesante la identificación por parte de los autores de que las supresiones de los genes supresores de tumores son más propensas a aparecer durante el proceso de reprogramación, mientras que la expansión de las células iPSC humanas parece tolerar la duplicación de los oncogenes. Aunque con un concepto distinto, otros informes han reforzado la idea de que las células somáticas y las células iPSC de por sí se someten a un proceso doble de selección que desecha las células que presentan mutaciones desfavorables en favor de las células que soportan mutaciones y que sustentan su mantenimiento en una célula parecida a las células ES. Se necesita una posterior confirmación para determinar si se trata del caso real. Paralelamente a estos estudios, Lyster et al. destacaron las diferencias en la metilación del ADN existentes entre las células ES humanas y las iPSC humanas. (Lister et al., 2011). Importante fue la observación de que las marcas epigenómicas anormales, llamadas Dominios Parcialmente Metilados (PMD), se mantuvieron en las líneas de las células iPSC humanas y posteriormente se transmitieron a derivados diferenciados. En términos generales, la desregulación observada de los genes marcados debido a las condiciones del cultivo (células ES o iPSC) y/o el proceso de reprogramación de por sí, pueden estar relacionados con la tumorigénesis así como con la alteración de la capacidad de diferenciación celular, y por tanto podrían comportar unos resultados negativos en las aplicaciones de las células madre pluripotentes.

Asimismo, además de los riesgos asociados con la mutagénesis por inserción y la posible transformación tumorigénica de las células pluripotentes o de sus derivados, la contaminación de las células diferenciadas con las células diferenciadas es otro obstáculo que debe salvarse antes de proceder a su traslado al ámbito clínico y a efectos de la medicina regenerativa. Para evitar este problema, se están estudiando en profundidad estrategias que permitan la exclusión de las células pluripotentes restantes de un grupo de células “listas para ser trasplantadas”. El desarrollo de los protocolos de diferenciación (véase a continuación) presenta un doble interés en este contexto. En primer lugar permite la obtención de células (pre)destinadas a un posterior trasplante o a ensayos de prueba de fármacos. En segundo lugar, si la eficiencia de la diferenciación alcanza el 100% permitirá la total eliminación de las células pluripotentes del cultivo. Por ahora no se dispone de un protocolo como este para ningún tipo de células, lo que implica la necesidad de desarrollar unas estrategias alternativas para eliminar las células pluripotentes residuales *in vitro* y/o *in vivo*. Los procedimientos estándar para abolir las células pluripotentes restantes tras la diferenciación confían en el uso de anticuerpos que reconozcan unos determinados marcadores de superficie de las células y los procedimientos de clasificación. Por consiguiente, la selección positiva o negativa de las células pluripotentes / de las células diferenciadas puede llevarse a cabo antes del trasplante (Tang et al., 2009). Además, varios estudios han demostrado que un anticuerpo citotóxico que reconozca la proteína podocalixina puede matar a las células ES humanas (Choo et al., 2008; Tan et al., 2009). A pesar del enorme interés de esta estrategia basada en anticuerpos, deben considerarse los problemas inherentes al uso de los anticuerpos como la posible activación de las vías descendentes o la inducción de una reacción inmunológica con posterioridad al trasplante. Una serie de informes recientes identificaron un determinado patrón glicoproteínico en las células pluripotentes que podría comportar el desarrollo de unas estrategias vinculadas con la lectina para la exclusión de las células madre pluripotentes de un grupo de células diferenciadas (Toyoda et al., 2011; Wang et al., 2011). No obstante, ninguna de

las estrategias actuales de clasificación de las células es lo suficientemente rigurosa para poder reducir el número de células pluripotentes restantes en la población de células clasificadas. Además, la clasificación de las células no evita el riesgo de la diferenciación espontánea *in vivo*, y por tanto es necesario el desarrollo de unas estrategias alternativas. Hasta la fecha, la adaptación de la tecnología del gen suicida, inicialmente desarrollada para el tratamiento del cáncer, representa en el estudio de las células pluripotentes una vía activa de investigación (Schuldiner et al., 2003). El principio consiste en la introducción genética de genes suicidas, normalmente a los órdenes de unos determinados genes promotores pluripotentes, con el objeto de controlar la muerte celular de las células pluripotentes *in vitro* e *in vivo* sin interferir en su pluripotencia ni en su capacidad de auto-renovación (Naujok et al., 2010). Los genes suicidas generalmente codifican enzimas sensibles a los fármacos como el gen de la Timidina Quinasa para el Ganciclovir, y responden al fármaco matando las células en las que se expresan. Otras tecnologías proponen interferir con los genes que son esenciales para el mantenimiento de una condición pluripotente, como el c-Myc, con el objeto de forzar la diferenciación de las células pluripotentes residuales. De igual modo se ha propuesto interferir con los genes relacionados con el teratoma que son prescindible para los tejidos maduros. Por consiguiente, se ha demostrado que la ablación de la expresión superviviente, a través de la genética o con métodos farmacológicos, induce la apoptosis en las células ES humanas (Blum et al., 2009).

En términos generales, aunque todavía no se ha podido demostrar que las células diferenciadas derivadas de las células pluripotentes son propensas a inducir tumores una vez trasplantadas a tejidos de adultos, la supervisión y el estricto control de los productos celulares pluripotentes será sin duda un requisito previo para las aplicaciones médicas.

2.2.3. Inmunogenicidad asociada con las células pluripotentes

El uso de células pluripotentes derivadas en aplicaciones clínicas afronta otro obstáculo en caso de considerar el desarrollo de productos celulares aptos para el trasplante. Además de la necesidad de establecer la seguridad de las células pluripotentes y de sus derivados en términos de tumorigenicidad, la superación de las barreras inmunológicas relacionadas con su trasplante constituye también un desafío. Debido a las razones éticas anteriormente comentadas (por ejemplo la clonación terapéutica), así como el posible rechazo inmunológico del trasplante de diferentes células derivadas de las células ES, la medicina regenerativa ha prestado especial atención a las células iPSC así como a otras fuentes alternativas, como las células derivadas de células madre de adultos y las células convertidas en linajes (véanse posteriores apartados). Teóricamente, la reprogramación de las células somáticas en células iPSC ofrece la posibilidad de generar tipos de células personalizadas aptas para el autotrasplante. Sin embargo, un estudio realizado por Zhao y sus colaboradores demostró recientemente que el trasplante de células iPSC no diferenciadas indujo una respuesta inmunológica incluso en trasplantes a animales singénicos (Zhao et al., 2011). Por ahora no está claro el origen de esta respuesta inmunológica y podría deberse a las anomalías epigenéticas y genéticas adquiridas durante el proceso de reprogramación y durante su posterior mantenimiento en cultivo (véase **Riesgos de cáncer relacionados con la pluripotencia**). Aunque se observó un rechazo inmunológico tras el trasplante de células iPSC en modelos de ratón singénicos, queda por demostrar si las células diferenciadas derivadas de las células iPS producirán la misma respuesta e incluso si, en caso de trasplante de poblaciones puras diferenciadas, dichas células causarán la formación de tumores.

2.3. Células pluripotentes y diferenciación: *aumento de las esperanzas para el ámbito clínico*

Poco después de su primer aislamiento, las células madre pluripotentes, teniendo en cuenta su capacidad para generar prácticamente todos los tipos de células que componen un organismo adulto, ofrecen la posibilidad de estudiar la biología del desarrollo humano en una placa de Petri. Recíprocamente, el conocimiento adquirido por los estudios del desarrollo en otros sistemas de modelos, ha facilitado nuestra comprensión del compromiso del linaje. Más allá del uso de las células pluripotentes para la revelación de los procesos del desarrollo, la posibilidad de impulsar de forma reproducible la diferenciación de las células madre pluripotentes en una determinada población celular, constituye una enorme esperanza para la curación de numerosas enfermedades, cuyos orígenes se encuentran en una deficiencia o disfunción celular y para las cuales todavía no se han encontrado unas moléculas eficientes. Tal como comentaremos más adelante, la diferenciación de las células madre pluripotentes en un tipo de células clínicamente relevantes, así como la posibilidad de corregir los genes de los genes mutantes, constituyen una alternativa para la terapia celular personalizada, pero también para el desarrollo de unas plataformas útiles para la selección de los fármacos y la modelación de las enfermedades.

2.3.1. *Generación de células clínicamente relevantes en una placa de Petri*

Aunque los mecanismos del desarrollo siguen siendo imprecisos, las lecciones aprendidas gracias a los estudios del desarrollo permitieron una mejor comprensión de los mecanismos que comportan la formación de un organismo multicelular complejo. Siguiendo esta línea, se ha demostrado la importancia de las diferentes vías de señalización que regulan, mantienen e impulsan la diferenciación de las células pluripotentes a lo largo del desarrollo (Young,

2011). Por consiguiente, la raíz de la mayoría de los protocolos de diferenciación *in vitro* confía en la capacidad de los signos extrínsecos para propagarse a través de las vías de transducción de los signos intracelulares que comportan la regulación de los genes concretos que controlan la muerte de las células. Por consiguiente, los factores que se consideran que influyen en la inducción de la capa germinal en el embrión, como el Wnt, el Nodal, el factor β (TGF- β) de transformación del crecimiento, el factor de crecimiento de los fibroblastos y la proteína morfogénica ósea, han sido satisfactoriamente trasladados a protocolos de diferenciación *in vitro* (Gadue et al., 2005; Murry y Keller, 2008). Ejemplo de ello es la necesidad evidente de la señalización de la proteína morfogénica ósea (BMP) para inducir las poblaciones de células mesodérmicas, al menos en la fase inicial de la diferenciación. En general, los protocolos de diferenciación confían normalmente en uno de los tres métodos indicados a continuación: i) la formación de cuerpos embrioides flotantes con anterioridad a la diferenciación; ii) una inducción directa de células madre pluripotentes mantenidas en una proteína de la matriz extracelular; iii) el co-cultivo de células madre pluripotentes en capas de células estromáticas. Sin ser exhaustivos, pueden debatirse varios ejemplos (uno por cada capa germinal) para los que se han contemplado unos protocolos de diferenciación reproducibles. En primer lugar, la diferenciación de las células madre pluripotentes en fenotipos neuronales, incluidas las neuronas, los oligodendrocitos y las células gliales, está siendo constantemente investigada y se han aplicado los hallazgos conseguidos por la biología del desarrollo para controlar tanto el compromiso neuronal de las células pluripotentes como la consiguiente especificación. Por tanto, la identificación de la ruta de señalización Notch, de la proteína Sonic hedgehog, de las familias FGF y TGF- β , así como de las rutas de señalización Wnt como principales protagonistas del establecimiento del neuroectodermo, los progenitores neuronales y las posteriores células neuronales diferenciadas en fase terminal, ha sido fundamental (Aubert et al., 2002; Kubo et al., 2004). Por consiguiente, ahora es posible derivar células funcionales, como las neuronas dopaminérgicas (Perrier et al., 2004) o las neuronas motoras (Wichterle et al., 2002), que

presentan un elevado interés en patologías como el Parkinson y la Esclerosis Amiotrófica Lateral, respectivamente. Y lo que es más interesante, no tan solo se ha demostrado la funcionalidad de las células neuronales generadas *in vitro* sino que también se ha demostrado la mejoría de modelos de animales tras el trasplante de células (Kim et al., 2002). Otra población de células de enorme interés para la medicina son las células cardíacas. Después de un ataque cardíaco, se pierden cantidades enormes de cardiomiocitos diferenciados, así como de células vasculares, en la zona dañada del corazón. Por tanto, podría conseguirse la derivación de importantes cantidades de células potencialmente capaces de reponer el corazón mediante la diferenciación dirigida de las células pluripotentes. De hecho se ha demostrado que el trasplante de cardiomiocitos contribuye a la recuperación de la función cardíaca en diversos modelos de animales (Cai et al., 2007). La posibilidad de generar células capaces de mantener una actividad latente en cultivo fue anunciada por primera vez por Doetschmany sus colaboradores (Doetschman et al., 1985). A partir de entonces, una mejor comprensión de estos mecanismos permitió la identificación del BMP4 y de la activina como dos importantes inductores de la diferenciación de los cardiomiocitos después de la inducción mesodérmica (Laflamme et al., 2007; Yao et al., 2006). Originadas por el endodermo, las células β pancreáticas son otro tipo de células sorprendentes para los estudios transnacionales. Debido a su capacidad de producir insulina, podría utilizarse el trasplante de células β pancreáticas para el tratamiento de la diabetes tipo I. Nuevamente la generación de células β pancreáticas confía en la síntesis *in vitro*, la activación secuencial de diversas rutas de señalización implicadas en el desarrollo normal de una población celular como esta. En 2006, D'Amour y sus colaboradores demostraron que una serie temporal de modulaciones de la ruta de señalización arbitrada por el factor de crecimiento, era capaz de imitar el desarrollo pancreático y que las células pluripotentes podían diferenciarse en células parecidas a las células β (D'Amour et al., 2006). Otras mejoras del protocolo han demostrado la funcionalidad de las células β derivadas de células pluripotentes tras el trasplante en modelos de animales (Jiang et al., 2007).

En resumen, se ha constatado un número cada vez mayor de protocolos de diferenciación. No obstante, hasta la fecha, ninguno de los protocolos reproducibles permite la generación de poblaciones puras. Además, un estudio reciente ha demostrado unas diferencias de transcripción evidentes entre los derivados de células pluripotentes *in vitro* y sus contrapartidas *in vivo* (Patterson et al., 2011). Este estudio podría explicar por qué a veces las células derivadas de las células pluripotentes no consiguen sintetizar determinadas funciones celulares que se encuentran *in vivo*. Ejemplo de ello son las células madre hematopoyéticas derivadas de células pluripotentes obtenidas con diferentes métodos que raramente, o no con carácter reproducible, contribuyen a la reconstitución del sistema hematopoyético en comparación con el trasplante tradicional de médula ósea. Teniendo esto en cuenta, los esfuerzos destinados al desarrollo de unos protocolos de diferenciación eficientes y aptos para su posterior trasplante en los humanos, por ejemplo sin componentes xenobióticos, así como los destinados a conseguir unas células diferenciadas totalmente funcionales, siguen siendo un área principal de la investigación antes de contemplar el traslado al ámbito clínico. Además, el número de células necesario para el trasplante es fundamental, y por tanto es importante ampliar los cultivos adecuados para satisfacer las demandas celulares necesarias para la aplicación clínica.

En resumen, existen varias cuestiones que obstaculizan el traslado de las tecnologías de las células madre al ámbito clínico, entre ellas las cuestiones éticas, el riesgo de formación de tumores y el rechazo inmunológico, así como el hecho de que la mayoría de las células diferenciadas de las células iPSC humanas parece ser funcionalmente inmadura. Un enfoque alternativo de reciente aparición dirigido por el Dr. Nakauchi y llamado complemento interespecífico de blastocistos, se ha considerado válido en la plataforma *in vivo* para la generación de órganos funcionales a partir de las células PSC. El complemento interespecífico de blastocistos se basa en un “nicho del desarrollo” vacío creado por el noqueado de unos determinados genes fundamentales para el

desarrollo natural de un órgano en particular y el uso de células PSC xenogénicas de tipo salvaje para colonizar el nicho vacante y generar las células/tejidos/órganos deseados. El debido desarrollo de este método aumenta la posibilidad de extraer células/tejidos/órganos de animales domésticos que puedan ser trasplantados a los humanos.

3. Conversión del linaje y plasticidad: los niños del futuro de la medicina regenerativa

Teniendo en cuenta todos los posibles inconvenientes que la tecnología de las células iPS debe superar para encontrar su camino al ámbito clínico, la tecnología ideal para el traslado al ámbito clínico comportará una oportunidad a corto plazo para obtener el linaje celular deseado, un protocolo de diferenciación eficiente y la total abolición de las condiciones pluripotentes, así como unos enfoques no integradores. Siendo conscientes de ello, se han descrito enfoques de reprogramación alternativos que evitan la reprogramación de la pluripotencia. De este modo, la conversión directa del linaje podría constituir un enfoque complementario a la tecnología de las células iPS. De hecho, tanto la tecnología de las células iPS como la conversión del linaje confían en el hecho de que el compromiso del linaje depende de un conjunto perfectamente definido de factores de transcripción (TF) (Graf y Enver, 2009). Unos determinados TF bajo el control de las rutas de señalización ascendentes son pues los responsables de activar y mantener el programa genético correcto que garantice la identidad de las células (Scheper y Copray, 2009). Por consiguiente, al igual que en la reprogramación de las células iPS, la modulación de unos determinados TF así como las rutas de señalización ascendentes que regulan la actividad de los TF, han abierto la posibilidad de la conversión directa de un linaje en otro. La conversión directa del linaje no implica la reversión a una condición pluripotente y por tanto abrevia el tiempo necesario para obtener los tipos de células deseados. Además, la falta de células madre pluripotentes durante el trasplante

debería, por definición, reducir el riesgo de cáncer ya que las células diferenciadas en fase terminal no poseerán la capacidad de auto-renovación y de diferenciación. Y lo que es más interesante, los procesos de conversión del linaje pueden diferenciarse en dos grupos principales: en primer lugar, aquellos procesos en los que unos determinados conjuntos de TF, propios del tipo de células objetivo, son sobreexpresados en la fuente celular inicial para cambiar el programa genético y epigenético de las células y forzar la expresión de los programas que definen la identidad del tipo de células objetivo. Davis y sus colaboradores describieron en 1987 este enfoque por primera vez. La expresión ectópica del MyoD en los fibroblastos de ratón permitió la generación de miotubos (Davis et al., 1987). La conversión de los fibroblastos en miotubos constituyó la “prueba del principio” de la plasticidad celular sin reversión a una condición pluripotente y la posterior diferenciación en un linaje distinto. Otros estudios han demostrado la posibilidad de intercambiar la identidad de las células mediante la introducción de una sola célula (Kulesa et al., 1995; Laiosa et al., 2006) o mediante una combinación de TF(s) (Ieda et al., 2010; Vierbuchen et al., 2010; Pang et al., 2011; Ambasudhan et al., 2011; Caiazzo et al., 2011; Son et al., 2011), así como mediante la ablación *in vivo* de los TF (Nutt et al., 1999). Por otra parte, varios informes recientes han señalado la posibilidad de inducir una conversión más general mediante la inducción parcial de plasticidad sin forzar el regreso de las células somáticas a un estado pluripotente. En una situación como esta, la sobreexpresión de los factores de pluripotencia, como el Oct4, el Sox2, el KLF4 y el c-Mycy/o quizás otras combinaciones, podría empujar a las células a un estado epigenético “abierto” ideal para una posterior manipulación mediante la manipulación de las rutas de señalización (Efe et al., 2011). Por consiguiente, puede utilizarse la combinación de un estado plástico parcialmente desdiferenciado, inducido por factores de pluripotencia pero sin alcanzar la totalidad de la pluripotencia, con unos medios definidos capaces de impulsar la rediferenciación, para la conversión directa de determinadas células somáticas en diversos linajes (Efe et al., 2011; Kim et al., 2011; Szabo et al., 2010).

4. Células madre adultas multipotentes: la alternativa a la pluripotencia

4.1. Aspectos generales

Si retomamos el modelo de paisaje descrito por Waddington, las células madre multipotentes, células progenitoras con un potencial de diferenciación más reducido, ocupan un lugar estratégico en la medicina regenerativa. Capaces de autorenovarse y de dar lugar a un número reducido de tipos de células diferenciadas, las células madre multipotentes desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos (Simon y Clevers, 2011). Presentes en unos microentornos definidos que regulan sus propiedades plásticas, los llamados “nichos de células madre”, estas células quiescentes responden a señales extrínsecas que les permiten mantener un grupo de células madre a la vez que generan unas células recién diferenciadas (Jones y Wagers, 2008). Estas células son enormemente prometedoras para el desarrollo de nuevas estrategias curativas, sobre todo porque superan muchas de las advertencias encontradas con el uso de las células madre pluripotentes, y por consiguiente facilitan su traslado al ámbito clínico. Como demostración de ello, las células madre multipotentes pueden derivarse directamente de los tejidos adultos, por lo tanto eliminan las cuestiones éticas relacionadas con las células ES y EG. Además, las células madre adultas no requieren determinadas manipulaciones *in vitro* que podrían comportar mutaciones genéticas, del modo que lo hacen los métodos tradicionales utilizados para la generación de células iPSC. Por último, y en determinadas condiciones, puede contemplarse el autotrasplante de células para evitar el rechazo inmunológico. Paralelamente al aislamiento de las células madre pluripotentes procedentes de los teratocarcinomas, los experimentos pioneros que muestran la reconstitución hematopoyética de los ratones irradiados tras el

trasplante de células adultas de la médula ósea fueron los inicios del trabajo sobre las células madre adultas (Ford et al., 1956; Nowell et al., 1956; Makinodan, 1956). Con la sugerencia de la presencia de un tipo de células en un nicho adulto capaz de generar diferentes tipos de células y repoblar un tejido dañado, esta observación revolucionó la antigua visión del cuerpo humano, es decir "lábil, estable y perenne". (Giulio Bizzozero). A partir de entonces, los avances han desembocado en la identificación y el aislamiento de las células madre adultas procedentes de otros varios tejidos adultos, incluida la piel, el hígado, los músculos, las diferentes zonas del cerebro, la médula espinal, la nariz, la médula ósea, el corazón y otros muchos. Esta diversidad de tejidos que contienen células madre adultas refleja la diversidad de las células madre adultas que hasta ahora han sido satisfactoriamente aisladas. Por consiguiente, y a diferencia de las células madre pluripotentes, resulta difícil encontrar un consenso general para la caracterización de las células madre adultas, como un determinado conjunto de marcadores, lo que complica aún más su identificación. Generalmente, en base a la observación de las células proliferativas situadas en el interior de una estructura, la prueba definitiva para una célula madre adulta "auténtica" reside en su capacidad de dar lugar a todos o al menos a algunos de los tipos de células del tejido del que han sido aisladas. Las diferentes familias de células madre adultas identificadas hasta la fecha comprenden las células madre neuronales, las células madre mesenquimales (posteriormente referidas como MSC) o las células madre hematopoyéticas. Y lo que es más importante, la mayoría de los métodos que permiten el mantenimiento de las células madre/progenitoras adultas en cultivo y su diferenciación en determinados linajes, están perfectamente establecidos (ver arriba). Además, varios estudios han destacado la eficacia de las células madre adultas o de sus derivadas para el tratamiento de una amplia variedad de modelos experimentales de enfermedades. Por consiguiente, el uso de las células madre/progenitoras adultas se basa en dos métodos distintos: i) el trasplante de células madre/progenitoras adultas; ii) el trasplante de células derivadas de células madre/progenitoras adultas. En general, las células madre

adultas son mucho más que una esperanza para el desarrollo de las terapias regenerativas y ya se utilizan en clínicas con carácter rutinario o en ensayos clínicos. Por tanto, y a diferencia de las células madre pluripotentes, no se tardó mucho en trasladar el primer descubrimiento de las células madre adultas al ámbito clínico, tal como lo ilustran las terapias basadas en el trasplante de médula ósea (Little y Storb, 2002). Hasta la fecha, todos los tipos de células madre adultas presentan un interés para el ámbito clínico, pero sobre todo, las células MSC son probablemente las primeras candidatas para el futuro de la medicina regenerativa.

4.2. Células madre mesenquimales: de camino al ámbito clínico

Aunque Arnold Caplan acuñó el término “células madre mesenquimales” (Caplan, 1991), los trabajos de Alexander Friedenstein fueron los primeros que aclararon un segundo tipo de células madre adultas residentes en el nicho de la médula ósea (Friedenstein et al., 1970, 1976). En principio, el término MSC se relacionó con el concepto general de células madre multipotentes, pero se fue adoptando progresivamente para describir las células madre mesenquimales. Además, la literatura carece de un consenso general al respecto y pueden encontrarse ambos términos en referencia a la misma población de células. Independientemente de la nomenclatura, las células MSC fueron descritas por primera vez como capaces de generar tejidos fibrosos y óseos a la vez que conservan las propiedades clonogénicas, y eran conocidas con el nombre de “Unidades de fibroblastos que forman colonias”. De hecho, la forma de un fibroblastoide caracteriza a las células MSC en cultivo y la diferenciación dirigida de las células MSC comportó la satisfactoria generación de varios tipos de células, en función del tejido fuente inicial del que fueron aisladas, incluidos los adipocitos, los osteocitos, los condrocitos, los miocitos, las neuronas, los hepatocitos y los cardiomiocitos. Cabe señalar que además de la médula ósea, las células MSC se han conseguido derivar de muchos otros tejidos adultos,

incluido el músculo esquelético, la dermis, el tejido adiposo, el hueso trabecular, el cordón umbilical, la membrana sinovial, el sistema circulatorio, el pericito, la pulpa dental, la nariz, el líquido amniótico, el corazón y otros muchos más (Beyer Nardi y da Silva Meirelles, 2006). Estas diferentes fuentes reflejan, en cierto modo, la heterogeneidad observada en la “súper familia de las células MSC” y cierta variabilidad en su potencial de diferenciación. Y lo que es más importante, la mayoría de estos tejidos son relativamente accesibles, lo que abre la posibilidad de utilizar células MSC para el autotrasplante de células. Dicho esto, el uso de las células MSC en la medicina regenerativa es un campo cada vez mayor con varios ejemplos que muestran un potencial terapéutico prometedor (Uccelli et al., 2011). De igual modo, otros estudios han demostrado que las células MSC pueden desempeñar una acción paracrina beneficiosa para la reparación de los tejidos mediante la secreción de moléculas bioactivas tales como los factores de crecimiento, las citocinas y las quimiocinas (Meirelles et al., 2009). Cabe destacar la identificación de la inmunomodulación mediatizada por las células MSC (Uccelli et al., 2008) y la migración/incorporación orientada a un determinado tumor (Dai et al., 2011). Esto aumenta la posibilidad de extender el uso de las células MSC para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y del cáncer, respectivamente. De hecho, las promesas del trasplante de células MSC están a punto de convertirse en una realidad clínica si tenemos en cuenta el creciente número de ensayos clínicos relacionados con las células MSC. Especial atención merece el uso de las células MSC en daños/enfermedades cardíacas, enfermedades degenerativas de huesos/cartílagos y en aplicaciones neurológicas e inmunológicas, tanto a través del trasplante directamente en el tejido o a través de la circulación sistémica. Aunque la seguridad de las terapias basadas en las células MSC ha quedado demostrada en muchos ensayos clínicos distintos, la evidencia de la regeneración tisular tras el trasplante es bastante reducida y los resultados conseguidos necesitan nuevas confirmaciones.

5. Edición genética y modelación de las enfermedades

El desarrollo de las tecnologías de edición genética en combinación con la generación de células iPSC específicas para el paciente, constituye una fusión de los campos de las células madre y de las terapias genéticas tradicionales. Las células iPSC derivadas de pacientes que soporten mutaciones monogénicas responsables del desarrollo de las enfermedades son un material ideal para la corrección *in vitro* del gen mutante y para el posterior trasplante de las células corregidas en el paciente. Además, las tecnologías de enfoque genético en células ES de ratón han contribuido enormemente a la comprensión de la función de los genes, del desarrollo animal y de las patologías. No obstante, el traslado del éxito del enfoque genético en las células ES de ratón a las células ES o iPSC humanas, ha sido difícil. La integración aleatoria de los transgenes, una característica común de la mayoría de los enfoques tradicionales de reprogramación, ha sido el método predominante para la modificación del genoma humano en el pasado. Sin embargo, los inconvenientes de este enfoque son ampliamente conocidos, incluido el potencial de mutagénesis por inserción que comporta la formación de tumores. Aunque la integración aleatoria de los transgenes mediada por la transducción viral o los elementos extrapolables sigue manteniendo su valor en muchas aplicaciones, gracias a su simplicidad y efectividad, el sector ha ido más allá y necesita unas vías más precisas para modificar el genoma humano. De hecho, varias publicaciones recientes han señalado la corrección satisfactoria de los genes que soportan mutaciones y responsables de las enfermedades (Li et al., 2011; Liu et al., 2011b; Soldner et al., 2011; Howden et al., 2011; Papapetrou et al., 2011). Por tanto pueden aplicarse varias tecnologías para la restauración genética de las copias genéticas de tipo salvaje, que en el contexto de una enfermedad monogénica, comporta al final la recuperación fenotípica y la mejora de la función. Por consiguiente, la corrección genética, a diferencia de la terapia genética tradicional en la que se explota la complementación genética en lugar de la corrección del gen mutante, comporta la unión del gen mutante y sus sustitución

por una inserción homóloga mediada por la recombinación de la versión del tipo salvaje del gen. Hasta ahora se han desarrollado varias tecnologías distintas, todas ellas con sus ventajas y sus inconvenientes. Además, las cuestiones más habituales relacionadas con el enfoque genético pueden resumirse como sigue: 1) una escasa eficiencia, sobre todo en las células pluripotentes y en los lugares transcripcionalmente inactivos; 2) efectos desfasados manifestados en una elevada toxicidad, una elevada incidencia de la integración aleatoria y otras respuestas mutagénicas debidas al propio proceso del enfoque. Quizás una de las tecnologías más extendidas actualmente es el uso de las nucleasas con dedos de zinc (ZFN) (Hockemeyer et al., 2009; Soldner et al., 2011). En pocas palabras, las nucleasas ZFN son proteínas diseñadas que reconocen unas determinadas secuencias del genoma. La actividad de la nucleasa comporta la generación de roturas de doble cadena del ADN (DSB) que pueden ser reparadas con dos mecanismos endógenos distintos, la recombinación homóloga, que redundaría en la corrección adecuada del gen objetivo, y la unión final no homóloga, un mecanismo de reparación del ADN propenso a errores que comporta la generación de mutaciones en el genoma del huésped. Otras tecnologías conocidas hasta ahora, incluido el uso de los adenovirus auxiliar-dependientes (HAdV)(Suzuki et al., 2008; Liu et al., 2011b), los cromosomas bacterianos artificiales (BAC)(Yang y Seed, 2003), las nucleasas efectoras y activadoras de la transcripción (TALENs)(Cermak et al., 2011), que conjuntamente con el sistema CRISPR/Cas desarrollado últimamente, son algunos de los enfoques más prometedores de la edición genética eficiente. Cabe señalar el hecho de que las amplias aplicaciones de las tecnologías de edición genética no tan solo cubren la corrección genética sino también la generación de unas líneas de células del reportero exactamente definidas que son enormemente valiosas para el estudio de los procesos de diferenciación habituales y para las pantallas de alta resolución. Además, determinadas sustituciones o desactivaciones de los genes de interés en las líneas de células pluripotentes, constituyen una herramienta inigualable para los estudios moleculares. A este respecto, las células iPSC derivadas del paciente no tan

solo suponen una enorme promesa en los términos de la corrección genética y de la medicina regenerativa, sino que también permite realizar un análisis conciso de los mecanismos moleculares que conllevan la manifestación y el avance de una determinada enfermedad. La modelación de las enfermedades presenta pues la posibilidad del descubrimiento y las pruebas de los fármacos *in vitro* y el desarrollo de terapias personalizadas (Dimos et al., 2008; Marchetto et al., 2010; Liu et al., 2011a; Brennand et al., 2011). Sin embargo, deben considerarse tres cuestiones importantes respecto al uso de las células iPSC para la modelación de enfermedades antes de su amplia aplicación en los estudios de descubrimiento de fármacos. En primer lugar, teniendo en cuenta la acumulación de anomalías epigenéticas/genéticas durante el proceso de reprogramación, cabe creer que las células iPSC derivadas del paciente pueden presentar funcionalidades anómalas. En este caso, las anomalías genéticas que comportan el desarrollo de las enfermedades pueden contribuir y/o catalizar la reprogramación defectuosa de las células somáticas en las células iPSC, una cuestión todavía no abordada y que puede resultar en una mala interpretación de los resultados. En segundo lugar, dos informes recientes han destacado las importantes diferencias entre las células ESC y las células iPSC en determinados contextos de enfermedades (Urbach et al., 2010).

En tercer lugar, el uso de las células iPSC derivadas del paciente soporta, por definición, otra limitación experimental importante, la falta de unas líneas de control adecuadas. Merece especial atención el hecho de que los defectos epigenéticos/genéticos asociados con la reprogramación, aunque se agrupan en unas rutas relacionadas con el cáncer, parecen ser aleatorios en lo que se refiere a determinados genes. Por tanto, el uso de diversas líneas de células iPSC, las derivadas de un paciente enfermo y las derivadas de individuos sanos, pueden de hecho soportar un número de diferencias epigenéticas/genéticas que desemboque en una mala interpretación de los resultados durante los estudios de descubrimiento del fármaco y los estudios de modelación de la enfermedad. En este caso un nuevo enfoque debería aprovecharse del desarrollo de unas nuevas tecnologías de edición genética para poder manipular las células

pluripotentes y las células ES “auténticas”, y no permitir la corrección genética aunque sí la modificación de las células en dirección contraria y la generación de las células ES propias de la enfermedad (Soldner et al., 2011). En este contexto, la generación de células ES que soporten genes mutantes y responsables de las enfermedades, podría constituir una fuente más fiable de células pluripotentes para la modelación de enfermedades como unión directa de genes de tipo salvaje, y la sustitución de los genes mutantes en las células pluripotentes evitará los pasos de reprogramación y todos sus “efectos secundarios” correspondientes. Siguiendo esta línea, evitar los pasos de reprogramación mediante la generación de las células ES propias de la enfermedad podría atajar la necesidad de validar las células iPSC derivadas del paciente y las posibles conclusiones erróneas que pudieran surgir por el uso de un modelo defectuoso de enfermedad *in vitro*.

6. Conclusiones

El conocimiento actual sobre las células madre y su regulación ha abierto la posibilidad de la manipulación genética de las células somáticas mediante la reprogramación nuclear. La reprogramación nuclear es la reprogramación de la pluripotencia, es decir, la generación de células con unas capacidades parecidas de autorrenovación y de diferenciación a las de las células madre embrionarias. Por tanto, la generación de células iPSC puede extenderse a la derivación de células de pacientes que soportan mutaciones monogénicas responsable de las enfermedades y sintetizadas *in vitro* tras su diferenciación en determinados linajes celulares. Por consiguiente, las células iPSC propias de pacientes pueden utilizarse para la modelación de enfermedades y el desarrollo de fármacos. Además, la rápida expansión del campo ha comportado la comprensión general de que la reprogramación de la transcripción mediatizada por los factores incluye no tan solo el logro de la pluripotencia sino también otros procesos que pueden comportar la conversión directa de un tipo de células en

otro distinto, el proceso de conversión del linaje. Tal como se ha comentado aquí, la posibilidad de generar *in vitro* todos los tipos de células deseados ofrece la oportunidad de subsanar cualquier daño del tejido perdido mediante la sustitución de las células. Además se han descrito varios problemas, incluida la inestabilidad genética y epigenética y la necesidad de su abordaje antes de su traslado al ámbito clínico. Como alternativa, el descubrimiento de grupos endógenos de células progenitoras multipotentes ofrece la oportunidad de utilizar directamente las células madre sin necesidad de otras modificaciones *in vitro*, lo que de este modo puede conllevar un traslado al ámbito clínico, más directo, tal como lo demuestra el incesante número de ensayos clínicos actualmente en curso. Por último, y teniendo en cuenta que las tecnologías de la edición genética están destinadas indistintamente a las células pluripotentes y a las células madre adultas, podría utilizarse la posibilidad de la corrección genética seguida de un autotrasplante para la curación de las enfermedades monogénicas heredadas por los pacientes. Por consiguiente, la combinación de la terapia genética y el campo de las células madre, abren la posibilidad de una nueva vía de tratamiento.

7. Referencias

- Allegrucci, C., Wu, Y. Z., Thurston, A., Denning, C. N., Priddle, H., Mummery, C. L., et al. (2007) Restriction landmark genome scanning identifies culture-induced DNA methylation instability in the human embryonic stem cell epigenome. *Human molecular genetics*, **16**(10), 1253–1268.
- Ambasudhan, R., Talantova, M., Coleman, R., Yuan, X., Zhu, S., Lipton, S. A., et al. (2011) Direct Reprogramming of Adult Human Fibroblasts to Functional Neurons under Defined Conditions. *Cell stem cell*, **9**(2), 113–118.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C. M., Jühr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., et al. (2011) Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell stem cell*, **8**(4), 376–388.
- Artzt, K., Dubois, P., Bennett, D., Condamine, H., Babinet, C., and Jacob, F. (1973) Surface antigens common to mouse cleavage embryos and primitive

teratocarcinoma cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **70**(10), 2988–2992.

Aubert, J., Dunstan, H., Chambers, I., and Smith, A. (2002) Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. *Nature biotechnology*, **20**(12), 1240–1245.

Beyer Nardi, N., and da Silva Meirelles, L. (2006) Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of experimental pharmacology*, (174) 249–282.

Blum, B., Bar-Nur, O., Golan-Lev, T., and Benvenisty, N. (2009) The anti-apoptotic gene survivin contributes to teratoma formation by human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*, **27**(3), 281–287.

Blum, B., and Benvenisty, N. (2009) The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells. *Cell cycle*, **8**(23), 3822–3830.

Blum, B., and Benvenisty, N. (2008) The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Advances in cancer research*, **100**, 133–158.

Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., and Robertson, E. (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, **309**(5965), 255–256.

Brennand, K. J., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhart, C., Tran, N., Sangar, S., et al. (2011) Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, **473**(7346), 221–225.

Brinster, R. L. (1974) The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *The Journal of experimental medicine*, **140**(4), 1049–1056.

Cai, J., Yi, F.F., Yang, X. C., Lin, G. S., Jiang, H., Wang, T., et al. (2007) Transplantation of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves cardiac function in infarcted rat hearts. *Cytotherapy*, **9**(3), 283–291.

Caiazzo, M., Dell'anno, M. T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., et al. (2011) Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*, **476**(7359), 224–227.

Caplan, A. I. (1991) Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, **9**(5), 641–650.

Carey, B. W., Markoulaki, S., Hanna, J., Saha, K., Gao, Q., Mitalipova, M., et al. (2009) Reprogramming of murine and human somatic cells using a single

polycistronic vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**(13), 157–162.

Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., et al. (2011) Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids research*, **39**(12), e82.

Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., et al. (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell stem cell*, **5**(1), 111–123.

Choo, A. B., Tan, H. L., Ang, S. N., Fong, W. J., Chin, A., Lo, J., et al. (2008) Selection against undifferentiated human embryonic stem cells by a cytotoxic antibody recognizing podocalyxin-like protein-1. *Stem cells*, **26**(6), 1454–1463.

Dai, L. J., Moniri, M. R., Zeng, Z.R., Zhou, J. X., Rayat, J., and Warnock, G. L. (2011) Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy. *Cancer letters*, **305**(1), 8–20.

Davis, R. L., Weintraub, H., and Lassar, A. B. (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, **51**(6), 987–1000.

Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., et al. (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, **321**(5893), 1218–1221.

Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *Journal of embryology and experimental morphology*, **87**, 27–45.

D'Amour, K. A., Bang, A. G., Eliazer, S., Kelly, O. G., Agulnick, A. D., Smart, N. G., et al. (2006) Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*, **24**(11), 1392–1401.

Efe, J. A., Hilcove, S., Kim, J., Zhou, H., Ouyang, K., Wang, G., et al. (2011) Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nature cell biology*, **13**(3), 215–222.

Evans, M. (1981) Origin of mouse embryonal carcinoma cells and the possibility of their direct isolation into tissue culture. *Journal of reproduction and fertility*, **62**(2), 625–631.

- Evans, M. J. (1972) The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells. *Journal of embryology and experimental morphology*,**28**(1), 163–176.
- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*,**292**(5819), 154–156.
- Ford, C. E., Hamerton, J. L., Barnes, D. W., and Loutit, J. F. (1956) Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*,**177**(4506), 452–454.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., and Lalykina, K. S. (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics*,**3**(4), 393–403.
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., and Kulagina, N. N. (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*,**4**(5), 267–274.
- Gadue, P., Huber, T. L., Nostro, M. C., Kattman, S., and Keller, G. M. (2005) Germ layer induction from embryonic stem cells. *Experimental hematology*,**33**(9), 955–964.
- Giorgetti, A., Montserrat, N., Aasen, T., Gonzalez, F., Rodríguez-Pizà, I., Vassena, R., et al. (2009) Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell stem cell*,**5**(4), 353–357.
- Gore, A., Li, Z., Fung, H. L., Young, J. E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., et al. (2011) Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*,**471**(7336), 63–67.
- Graf, T., and Enver, T. (2009) Forcing cells to change lineages. *Nature*,**462**(7273), 587–594.
- Hockemeyer, D., Soldner, F., Beard, C., Gao, Q., Mitalipova, M., DeKolver, R. C., et al. (2009) Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology*,**27**(9), 851–857.
- Howden, S. E., Gore, A., Li, Z., Fung, H. L., Nisler, B. S., Nie, J., et al. (2011) Genetic correction and analysis of induced pluripotent stem cells from a patient with gyrate atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**108**(16), 6537–6542.
- Ieda, M., Fu, J. D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B. G., et al. (2010) Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*,**142**(3), 375–386.

- Jiang, W., Shi, Y., Zhao, D., Chen, S., Yong, J., Zhang, J., et al. (2007) In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell research*, **17**(4), 333–344.
- Jones, D. L., and Wagers, A. J. (2008) No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **9**(1), 11–21.
- Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Martí, M., Raya, A., and Belmonte, J. C. I. (2010) Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*, **464**(7288), 606–609.
- Kahan, B. W., and Ephrussi, B. (1970) Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *Journal of the National Cancer Institute*, **44**(5), 1015–1036.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009) Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, **458**(7239), 771–775.
- Kim, D., Kim, C. H., Moon, J. I., Chung, Y. G., Chang, M. Y., Han, B. S., et al. (2009a) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell*, **4**(6), 472–476.
- Kim, H. S., Oh, S. K., Park, Y. B., Ahn, H. J., Sung, K. C., Kang, M. J., et al. (2005) Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem cells*, **23**(9), 1228–1233.
- Kim, J. B., Sebastiano, V., Wu, G., Araúzo-Bravo, M. J., Sasse, P., Gentile, L., et al. (2009b) Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*, **136**(3), 411–419.
- Kim, J., Efe, J. A., Zhu, S., Talantova, M., Yuan, X., Wang, S., et al. (2011) Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(19), 7838–7843.
- Kim, J. H., Auerbach, J. M., Rodríguez-Gómez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., et al. (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*, **418**(6893), 50–56.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., et al. (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*, **467**(7313), 285–290.
- Kleinsmith, L. J., and Pierce, G. B. (1964) Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer research*, **24**, 1544–1551.

- Knoepfler, P. S. (2009) Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem cells*,**27**(5), 1050–1056.
- Kubo, A., Shinozaki, K., Shannon, J. M., Kouskoff, V., Kennedy, M., Woo, S., et al. (2004) Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development*,**131**(7), 1651–1662.
- Kulesa, H., Frampton, J., and Graf, T. (1995) GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes & development*,**9**(10), 1250–1262.
- Laflamme, M. A., Chen, K. Y., Naumova, A. V., Muskheli, V., Fugate, J. A., Dupras, S. K., et al. (2007) Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature biotechnology*,**25**(9), 1015–1024.
- Laiosa, C. V., Stadtfeld, M., Xie, H., de Andres-Aguayo, L., and Graf, T. (2006) Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity*,**25**(5), 731–744.
- Laurent, L. C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., et al. (2011) Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell stem cell*,**8**(1), 106–118.
- Li, H., Haurigot, V., Doyon, Y., Li, T., Wong, S. Y., Bhagwat, A. S., et al. (2011) In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature*,**475**(7355), 217–221.
- Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y. S., Hawkins, R. D., Nery, J. R., Hon, G., et al. (2011) Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*,**471**(7336), 68–73.
- Little, M. T., and Storb, R. (2002) History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature reviews. Cancer*,**2**(3), 231–238.
- Liu, G. H., Barkho, B. Z., Ruiz, S., Diep, D., Qu, J., Yang, S. L., et al. (2011a) Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*,**472**(7342), 221–225.
- Liu, G. H., Suzuki, K., Qu, J., Sancho-Martinez, I., Yi, F., Li, et al. (2011b) Targeted Gene Correction of Laminopathy-Associated LMNA Mutations in Patient-Specific iPSCs. *Cell stem cell*,**8**(6), 688–694.

- Maitra, A., Arking, D. E., Shivapurkar, N., Ikeda, M., Stastny, V., Kassaei, K., et al. (2005) Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nature genetics*, **37**(10), 1099–1103.
- Makinodan, T. (1956) Circulating rat cells in lethally irradiated mice protected with rat bone marrow. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **92**(1), 174–179.
- Marchetto, M. C. N., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y., et al. (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*, **143**(4), 527–539.
- Martin, G. R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **78**(12), 7634–7638.
- Martin, G. R., and Evans, M. J. (1975a) Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **72**(4), 1441–1445.
- Martin, G. R., and Evans, M. J. (1975b) Multiple differentiation of clonal teratocarcinoma stem cells following embryoid body formation in vitro. *Cell*, **6**, 467–474.
- Martin, G. R., and Evans, M. J. (1974) The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell*, **2**(3), 163–172.
- Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B. L. (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, **70**(5), 841–847.
- Meirelles, L. da S., Fontes, A. M., Covas, D. T., and Caplan, A. I. (2009) Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & growth factor reviews*, **20**(5-6), 419–427.
- Mintz, B., and Illmensee, K. (1975) Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **72**(9), 3585–3589.
- Murry, C. E., and Keller, G. (2008) Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*, **132**(4), 661–680.

- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., et al. (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology*, **26**(1), 101–106.
- Naujok, O., Kaldrack, J., Taivankhuu, T., Jörns, A., and Lenzen, S. (2010) Selective Removal of Undifferentiated Embryonic Stem Cells from Differentiation Cultures Through HSV1 Thymidine Kinase and Ganciclovir Treatment. *Stem Cell Reviews and Reports*, **6**(3), 450–461.
- Noggle, S., Fung, H. L., Gore, A., Martinez, H., Satriani, K. C., Prosser, R., et al. (2011) Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state. *Nature*, **478**(7367), 70–75.
- Nowell, P. C., Cole, L. J., Habermeyer, J. G., and Roan, P. L. (1956) Growth and continued function of rat marrow cells in x-radiated mice. *Cancer research*, **16**(3), 258–261.
- Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G., and Busslinger, M. (1999) Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature*, **401**(6753), 556–562.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, **322**(5903), 949–953.
- Pang, Z. P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D. R., Yang, T. Q., et al. (2011) Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*, **476**(7359), 220–223.
- Papaioannou, V. E., McBurney, M. W., Gardner, R. L., and Evans, M. J. (1975) Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature*, **258**(5530), 70–73.
- Papapetrou, E. P., Lee, G., Malani, N., Setty, M., Riviere, I., Tirunagari, L. M. S., et al. (2011) Genomic safe harbors permit high β -globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*, **29**(1), 73–78.
- Patterson, M., Chan, D. N., Ha, I., Case, D., Cui, Y., Handel, B. V., et al. (2011) Defining the nature of human pluripotent stem cell progeny. *Cell research*
- Perrier, A. L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M. E., Bruses, J., Topf, N., et al. (2004) Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**(34), 12543–12548.

- Phanstiel, D. H., Brumbaugh, J., Wenger, C. D., Tian, S., Probasco, M. D., Bailey, D. J., et al. (2011) Proteomic and phosphoproteomic comparison of human ES and iPS cells. *Nature Methods*, **8**(10), 821–827.
- Pierce, G. B., Dixon, F. J., and Verney, E. L. (1960) Teratocarcinogenic and tissue-forming potentials of the cell types comprising neoplastic embryoid bodies. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **9**, 583–602.
- Pierce, G. B., and Dixon, F. J. (1959) Testicular teratomas. II. Teratocarcinoma as an ascitic tumor. *Cancer*, **12**(3), 584–589.
- Pierce, G. B., and Verney, E. L. (1961) An in vitro and in vivo study of differentiation in teratocarcinomas. *Cancer*, **14**, 1017–1029.
- Polo, J. M., Liu, S., Figueroa, M. E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K. Y., et al. (2010) Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*, **28**(8), 848–855.
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature biotechnology*, **18**(4), 399–404.
- Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., and Evans, M. (1986) Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*, **323**(6087), 445–448.
- Rosenthal, M. D., Wishnow, R. M., and Sato, G. H. (1970) In vitro growth and differentiation of clonal populations of multipotential mouse cells derived from a transplantable testicular teratocarcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, **44**(5), 1001–1014.
- Rossant, J. (1975) Investigation of the determinative state of the mouse inner cell mass. II. The fate of isolated inner cell masses transferred to the oviduct. *Journal of embryology and experimental morphology*, **33**(4), 991–1001.
- Scheper, W., and Copray, S. (2009) The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch. *Stem cell reviews*, **5**(3), 204–223.
- Schuldiner, M., Itskovitz-Eldor, J., and Benvenisty, N. (2003) Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a “suicide” gene. *Stem cells*, **21**(3), 257–265.
- Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., et al. (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human

primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(23), 13726–13731.

Simons, B. D., and Clevers, H. (2011) Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell*, **145**(6), 851–862.

Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G. W., Cook, E. G., et al. (2009) Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*, **136**(5), 964–977.

Soldner, F., Laganière, J., Cheng, A. W., Hockemeyer, D., Gao, Q., Alagappan, R., et al. (2011) Generation of Isogenic Pluripotent Stem Cells Differing Exclusively at Two Early Onset Parkinson Point Mutations. *Cell*, **146**(2), 318–331.

Son, E. Y., Ichida, J. K., Wainger, B. J., Toma, J. S., Rafuse, V. F., Woolf, C. J., et al. (2011) Conversion of Mouse and Human Fibroblasts into Functional Spinal Motor Neurons. *Cell Stem Cell*, **9**(3), 205–218.

Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, **322**(5903), 945–949.

Stevens, L. C. (1973) A new inbred subline of mice (129-terSv) with a high incidence of spontaneous congenital testicular teratomas. *Journal of the National Cancer Institute*, **50**(1), 235–242.

Stevens, L. C., and Little, C. C. (1954) Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **40**(11), 1080–1087.

Suzuki, K., Mitsui, K., Aizawa, E., Hasegawa, K., Kawase, E., Yamagishi, T., et al. (2008) Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**(37), 13781–13786.

Szabo, E., Rampalli, S., Risueño, R. M., Schnerch, A., Mitchell, R., Fiebig-Comyn, et al. (2010) Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature*, **468**(7323), 521–526.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., et al. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, **131**(5), 861–872.

- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**(4), 663–676.
- Tan, H. L., Fong, W. J., Lee, E. H., Yap, M., and Choo, A. (2009) mAb 84, a cytotoxic antibody that kills undifferentiated human embryonic stem cells via oncosis. *Stem cells*, **27**(8), 1792–1801.
- Tang, C., Lee, A. S., Volkmer, J. P., Sahoo, D., Nag, D., Mosley, A. R., et al. (2011) An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells. *Nature Biotechnology*, **29**(9), 829–834.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., et al. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, **282**(5391), 1145–1147.
- Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., et al. (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**(17), 7844–7848.
- Toyoda, M., Yamazaki-Inoue, M., Itakura, Y., Kuno, A., Ogawa, T., Yamada, M., Akutsu, H., et al. (2011) Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. *Genes Cells*, **16**(1), 1–11.
- Uccelli, A., Laroni, A., and Freedman, M. S. (2011) Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet neurology*, **10**(7), 649–656.
- Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, **8**(9), 726–736.
- Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G. Q., and Benvenisty, N. (2010) Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*, **6**(5), 407–411.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C., and Wernig, M. (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, **463**(7284), 1035–1041.
- Waddington, C. (1957) *The Strategy of the genes, a discussion of some aspects of theoretical biology* (London: G. Allen and Unwin).

- Wang, Y. C., Nakagawa, M., Garitaonandia, I., Slavin, I., Altun, G., Lacharite, R. M., et al. (2011) Specific lectin biomarkers for isolation of human pluripotent stem cells identified through array-based glycomic analysis. *Cell research*
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y. H., Li, H., Lau, F., et al. (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell stem cell*, **7**(5), 618–630.
- Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J. A., and Jessell, T. M. (2002) Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*, **110**(3), 385–397.
- Wilmut, I., Beaujean, N., de Sousa, P. A., Dinnyes, A., King, T. J., Paterson, L. A., et al. (2002) Somatic cell nuclear transfer. *Nature*, **419**(6907), 583–586.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K. H. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, **385**(6619), 810–813.
- Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., et al. (2009) piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, **458**(7239), 766–770.
- Yang, Y., and Seed, B. (2003) Site-specific gene targeting in mouse embryonic stem cells with intact bacterial artificial chromosomes. *Nature biotechnology*, **21**(4), 447–451.
- Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G. M., Hayek, A., et al. (2006) Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**(18), 6907–6912.
- Young, R. A. (2011) Control of the embryonic stem cell state. *Cell*, **144**(6), 940–954.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I., and Thomson, J. A. (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, **324**(5928), 797–801.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, et al. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, **318**(5858), 1917–1920.
- Zhao, T., Zhang, Z. N., Rong, Z., and Xu, Y. (2011) Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*, **474**(7350), 212–215.

Zhou, H., Wu, S., Joo, J. Y., Zhu, S., Han, D. W., Lin, T., et al. (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell stem cell*, **4**(5), 381–384.