

## REPROGRAMACIÓN NUCLEAR Y CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUCIDAS

ORLANDO CHAPARRO, PH.D.<sup>1\*</sup> Y ORIETTA BELTRÁN, MD, M.Sc.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Profesor asociado Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.

<sup>2</sup> Profesora asistente Facultad de Medicina, Universidad Militar Nueva Granada, Bogotá, Colombia.

### Resumen

La reprogramación de células somáticas para generar células madre pluripotentes inducidas (iPS), ha sido uno de los avances más importantes de la biología en los últimos años. La identificación de un grupo de factores de transcripción y más recientemente de algunos compuestos químicos que pueden inducir la pluripotencia en células somáticas, brinda una oportunidad única para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares de la diferenciación celular y promete la posibilidad de generar células pluripotentes paciente-específicas para el tratamiento de múltiples enfermedades en protocolos de terapia celular y medicina regenerativa.

**Palabras clave:** reprogramación nuclear, pluripotencia, factores de reprogramación, células pluripotentes inducidas (iPS).

### NUCLEAR REPROGRAMMING AND INDUCED PLURIPOTENT CELLS

#### Abstract

Reprogramming of somatic cells to generate induced pluripotent stem cells (iPS), has been one of the most important advances in biology in recent years. The identification of a group of transcription factors and more recently of some chemical compounds that can induce pluripotency in somatic cells provides a unique opportunity to study cellular and molecular mechanisms of cell differentiation and promises the possibility of generating patient-specific pluripotent stem cells for the treatment of multiple diseases in protocols of cell therapy and regenerative medicine.

**Key words:** nuclear reprogramming, pluripotency, reprogramming factors, Induced pluripotent Stem Cells (iPS).

### REPROGRAMAÇÃO NUCLEAR E CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUZIDAS

#### Resumo

A reprogramação de células somáticas para gerar células-tronco pluripotentes induzidas (iPS), tem sido um dos mais importantes avanços na biologia nos últimos anos. A identificação de um conjunto de fatores de transcrição e, mais recentemente, de alguns compostos químicos que podem induzir pluripotência em células somáticas produzem uma oportunidade única para estudar os mecanismos celulares e moleculares da diferenciação celular e promete a capacidade de gerar células pluripotentes

---

\* Correspondencia: Orlando Chaparro [ochaparro@unal.edu.co](mailto:ochaparro@unal.edu.co). Dirección postal: Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina. Departamento de Ciencias Fisiológicas. Oficina 430. Ciudad Universitaria. Bogotá, Colombia. Teléfono: 3165000 Ext. 15059-57. Recibido: Noviembre 5 de 2009, Aceptado: Diciembre 11 de 2009

doente-específicas para o tratamento de doenças múltiplas nos protocolos de terapia celular e medicina regenerativa.

**Palavras-chave:** reprogramação nuclear, pluripotência, fatores de reprogramação, as células pluripotentes induzidas (iPS).

---

## GLOSARIO

**Célula Totipotente:** Célula con la capacidad de dar origen a todas las células de un organismo, incluyendo la línea germinal y el tejido embrionario y extraembrionario. El cigoto es la célula totipotente por excelencia.

**Célula Pluripotente:** Célula que puede dar origen a todas las células de un individuo, pero no al tejido extraembrionario. Las células de la masa celular interna del blastocisto y las células madre embrionarias son pluripotentes.

**Célula Multipotente:** Célula que puede dar origen a todos los tipos celulares de un determinado linaje. Las células madre adultas, por ejemplo las células madre hematopoyéticas y las células madre mesenquimales, son células multipotentes.

**Reprogramación Nuclear:** Cambios moleculares y funcionales que modifican el destino celular. Se utiliza para describir el proceso que lleva al núcleo de una célula diferenciada hacia el estado de pluripotencia.

**Célula Pluripotente Inducida (iPS):** Célula somática que ha sido sometida a un proceso de reprogramación nuclear mediante la expresión ectópica de factores de transcripción específicos y que adquiere características moleculares y funcionales de pluripotencia que la hacen semejante a una célula madre embrionaria.

---

## Introducción

El campo de las Células Madre ha revolucionado muchos los paradigmas de la biología y se ha convertido en una de las alternativas más prometedoras para la medicina del futuro. El concepto de célula madre se encuentra ya presente en la literatura científica del siglo XIX. Ernets Haekel, biólogo alemán, defensor de la teoría de la evolución de Darwin, elaborando una serie de árboles filogenéticos, utiliza por primera vez el término “*Stammzelle*” (término alemán para *stem cell*, o célula madre), para referirse al progenitor unicelular a partir del cual habrían evolucionado los organismos multicelulares. Más tarde, en su libro *Anthropogenie*, a propósito de los conceptos de filogenia y ontogenia, propone llamar también al óvulo fertilizado, *stammzelle*. Es decir, Haekel utilizó el término “célula madre” en dos contextos diferentes: el progenitor unicelular de los organismos pluricelulares y el óvulo fertilizado que da origen a todas las células del organismo (Véase la revisión de Ramalho-Santos y Willenbring (1)).

Dos características definen a la célula madre: En primer lugar su capacidad de autorreplicación y en segundo lugar, su capacidad de diferenciación dando origen a uno o más tipos o linajes celulares. Por lo tanto, el concepto de célula madre incluye un amplio rango de células con diferentes capacidades de proliferación y diferenciación (2,3). Las células madre se han clasificado de acuerdo con diferentes criterios: De acuerdo con una organización jerárquica de la diferenciación celular, la cual determina su potencial de desarrollo, se clasifican como **totipotentes**, aquellas con capacidad para dar origen a un organismo completo incluyendo el tejido germinal y las envolturas extraembrionarias; **pluripotentes**, las células que son capaces de dar origen a células de las tres capas germinales y **multipotentes**, u **órgano específico**, las que dan origen a células de un tejido u órgano particular. Las células madre pueden también clasificarse de acuerdo con su origen en **células madre embrionarias** (ESCs: *Embryonic Stem Cells*), células pluripotentes que se obtienen de la masa celular interna del blastocisto, **células madre germinales embrionarias** (GSCs: *Germinal Stem Cells*), células pluripotentes que se obtienen de la cresta gonadal del feto y **células madre adultas** (ASCs: *Adult Stem Cells*), células multipotentes que se originan de tejidos adultos maduros. Cada uno de estos tipos celulares tiene características diferentes y por lo tanto, dependiendo de las circunstancias, ventajas o desventajas, frente a las demás (2).

Actualmente, la terapia celular ha surgido como una opción de gran relevancia clínica para la regeneración tisular. Ya que todos los órganos contienen más de un tipo celular, la célula más adecuada en terapia regenerativa sería una célula madre que: 1) posea una alta capacidad de autorrenovación y potencial regenerativo y 2) sea capaz de generar tejidos con células de las tres capas germinales (por ejemplo, parénquima, tejido conectivo, vasos, tejido nervioso, etc.). Las células que cumplen estos requisitos serían células pluripotentes, como las aisladas a partir de la masa celular interna del blastocisto: células madre

embrionarias humanas o células stem embrionarias humanas (*hESCs: human Embryonic Stem cells*) (4). Sin embargo, ante las limitaciones para la utilización de las *hESCs*, la comunidad científica se ha enfocado en la búsqueda de alternativas para obtener células pluripotentes, idealmente paciente-específicas, para ser utilizadas en terapia regenerativa.

Más de una década después de que las *hESCs* fueron aisladas por primera vez (5), es evidente el avance en el conocimiento de su biología, características y en el desarrollo de técnicas para su obtención y manipulación en el laboratorio. Por otra parte, son crecientes también las expectativas de su utilidad como modelos para el estudio de la biología del desarrollo, el escrutinio de nuevos fármacos y principalmente, de su uso potencial como alternativa terapéutica para un gran número de enfermedades. Existen sin embargo, numerosas barreras que deben superarse antes de que las *hESCs* puedan ser una realidad como terapia de trasplante celular. El aislamiento de las *hESCs* a partir de la masa celular interna del blastocisto, implica necesariamente la destrucción del embrión, convirtiéndose por lo tanto en un procedimiento éticamente cuestionable. El aspecto ético sigue estando en el centro del debate y la pregunta fundamental sigue siendo, si es moralmente aceptable la utilización de las *hESCs* en terapias celulares a expensas de la destrucción de un embrión humano (6).

Las restricciones impuestas en varios países del mundo a la investigación con *hESCs*, estimuló la búsqueda de nuevas alternativas para su obtención. En Mayo de 2005, el Consejo Presidencial de Bioética de los Estados Unidos, planteó una propuesta para la búsqueda de fuentes alternativas de células pluripotentes (Véase el informe: *The President's Council on Bioethics. Alternative Sources of Pluripotent Stem Cells. Disponible en: [http://www.bioethics.gov/reports/white\\_paper/alternative\\_sources\\_white\\_paper.pdf](http://www.bioethics.gov/reports/white_paper/alternative_sources_white_paper.pdf). May 2005*). Una de las alternativas planteadas en el informe, para la obtención de células pluripotentes, fue “la reprogramación de células somáticas diferenciadas, para restaurar en ellas la pluripotencia típica de las *hESCs*”. Basados en este principio, Takahashi, y col., demostraron que induciendo la expresión de un grupo de genes de pluripotencia, Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4, mediante transducción retroviral, en fibroblastos de ratón, era posible reprogramar el desarrollo celular y obtener células con características muy similares a

las *ESCs* (7) y denominaron a estas células “Células Madre Pluripotentes Inducidas”, o células iPS, por su denominación en inglés “*induced pluripotent stem cells*”. Más recientemente, usando una metodología similar, varios estudios han reportado la obtención de iPS humanas (8,9). De esta manera, la obtención de células pluripotentes humanas, semejantes a las *hESCs*, no requiere la utilización de embriones, ni de oocitos humanos y permite a la comunidad científica desarrollar una fuente de células pluripotentes, viable técnicamente y socialmente aceptable (6).

### Reprogramación nuclear y generación de líneas de células pluripotentes inducidas (iPS)

La capacidad de una *ESC* de dar origen a todas las células del embrión y del adulto, ya sea en cultivo o en el embrión en desarrollo, se ha denominado **Pluripotencia**. La pluripotencia se mantiene por un breve período de tiempo durante el desarrollo embrionario de los mamíferos, en las células de la masa celular interna (ICM) del blastocisto y en el epiblasto del embrión pre-gastrulación; se preserva también en los primordios de las células germinales durante el desarrollo tardío hasta la etapa adulta. La pérdida de la pluripotencia y la diferenciación a linajes celulares específicos conlleva cambios en los patrones de expresión génica que incluyen el silenciamiento de genes que codifican para factores de transcripción claves para el mantenimiento de la pluripotencia, la expresión de genes inductores de la diferenciación y cambios epigenéticos de la cromatina (10).

Dada la capacidad de diferenciación de una célula pluripotente a todos los tipos celulares del organismo y su capacidad de proliferar por períodos indefinidos de tiempo sin perder sus características, estas células se consideran una fuente ideal para las aplicaciones terapéuticas. La reprogramación de una célula somática diferenciada a una célula pluripotente, que se asemeja a una *ESC*, es uno de los avances más impactantes en el campo de la biología celular en la última década y representa, una aproximación muy prometedora para la terapia celular y la medicina regenerativa. A pesar de las diferencias tan complejas en los patrones de expresión génica entre una célula pluripotente, como la *ESC* y una célula somática, el hecho de que se pueda generar un organismo completo a partir del núcleo de una célula somática, cuando este es transferido a un oocito no fertilizado, previamente enucleado (proceso conocido como clonación), demuestra que

los patrones de expresión génica de una célula que ha alcanzado su diferenciación terminal, se pueden reprogramar (11,12).

Son varios los métodos que se han investigado para inducir la reprogramación de células somáticas, incluyendo la transferencia nuclear de células somáticas (SCNT: *somatic cell nuclear transfer*), la exposición de células somáticas a extractos de células embrionarias, la fusión celular y más recientemente, la utilización de factores de transcripción específicos y compuestos químicos conocidos como moléculas pequeñas (13-17) (Figura 1). La SCNT constituye el primer intento de reprogramar una célula somática a una célula pluripotente. Los experimentos pioneros en anfibios (18,19), y más tarde en mamíferos con la clonación de la oveja Dolly (12), demostraron que los genomas de las células somáticas adultas mantienen su capacidad de generar

animales clonados viables, indicando que las restricciones en el genoma impuestas durante el desarrollo y los cambios durante la diferenciación celular, son reversibles y se deben a modificaciones epigenéticas y no a cambios permanentes en el genoma (21). Evidencia reciente indica que extractos citoplasmáticos y nucleares de células indiferenciadas pueden inducir la reprogramación de la expresión génica y promover la pluripotencia en células con capacidad de desarrollo y diferenciación restringidas. Así, extractos de células de carcinoma embrionario o de ESCs, inducen un cambio en el programa transcripcional de las células blanco, estimulando la expresión de genes de pluripotencia como *Oct4* y *Nanog*, inhibiendo la expresión de marcadores específicos de células somáticas e induciendo cambios epigenéticos a nivel de la estructura de la cromatina (22-23).

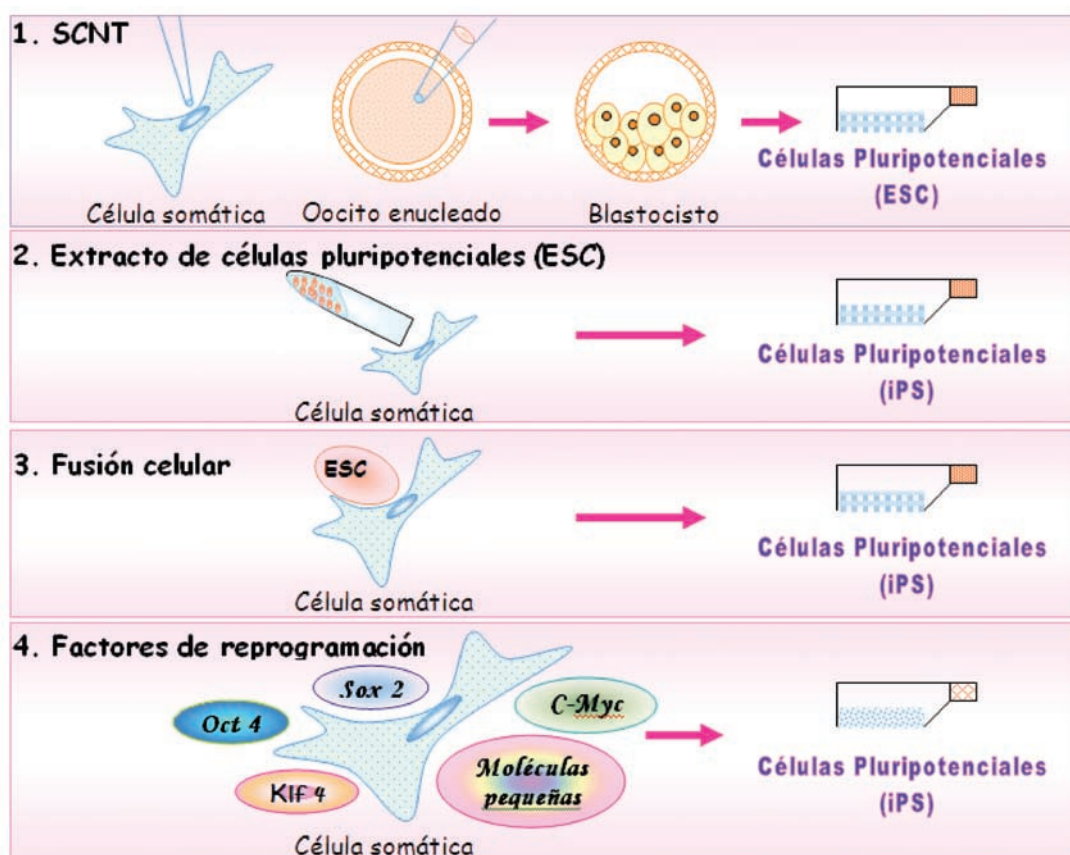


FIGURA 1. Métodos para la reprogramación de células somáticas



La inducción de la reprogramación nuclear mediante fusión celular se inicia con estudios de los grupos de Tada, Cowan y Yu, entre otros, quienes reportaron que la fusión de una célula somática con una *hESC*, conducía a la de-diferenciación del núcleo de la célula somática (24-28). Estas observaciones demostraron que ciertos factores, presentes en las *hESCs*, eran capaces de inducir la de-diferenciación de la célula somática, induciendo la expresión de algunos genes marcadores de pluripotencia como Oct4 y Nanog y además reprogramando el estado epigenético de la célula somática, como se evidencia por los cambios en los patrones de metilación de las regiones promotoras de genes de pluripotencia celular (6,28). La búsqueda de la identificación de los factores inductores de la de-diferenciación, se inició con el análisis de 24 factores preseleccionados en el sistema murino, por el grupo de Shinya Yamanaka, lo cual condujo a la identificación de cuatro genes que son los que se utilizan más ampliamente en los protocolos de de-diferenciación: Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4 (7,28). Esta misma combinación de factores funciona también con fibroblastos humanos (8). Los investigadores han utilizado diferentes técnicas para inducir la expresión de los factores de pluripotencia en varios tipos de células adultas. El método más común es la transducción génica utilizando retrovirus y más recientemente lentivirus (7-9,29). Este método sin embargo, presenta el problema de generar un alto riesgo de inducir mutaciones en los sitios de inserción del retrovirus y de modificar de manera permanente el genoma de las iPS así generadas. Varios métodos alternativos se han propuesto, tratando de resolver este problema: La utilización de adenovirus no integrativos (30), la transfección transitoria con plásmidos (31), el uso de transposones (*piggyBac transposition System*) (32) y el uso de virus que pueden retirarse de la célula una vez han cumplido su objetivo de inducir la expresión de los genes de pluripotencia, mediante el sistema Cre (*Cre-excisable virus*) (33,34). Todos estos métodos sin embargo, implican la exposición de las células a material genético exógeno y aunque, por lo menos en teoría minimizan el riesgo de modificación del genoma de la célula blanco, este riesgo no puede ser descartado de manera absoluta, lo que limita la eventual utilización de las iPS en protocolos de terapia celular.

### Proteínas recombinantes para la generación de iPS

En el 2009 se publicaron trabajos que prometen cambiar radicalmente la tecnología de las iPS y que para algunos investigadores, constituyen “el santo

grial de la regeneración”: inducir la pluripotencia en células somáticas sin la utilización de ADN. El grupo de Sheng Ding, del *Scripps Research Institute* en La Jolla, California, reporta la obtención de iPS añadiendo directamente las proteínas recombinantes Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4, producidas en *E. coli*, a fibroblastos de ratón en cultivo (14). Usando una variación de la técnica, el grupo de Kim, del Instituto de Células Stem de Corea y sus colaboradores del Instituto de Células Stem de Harvard, reportan la obtención de iPS a partir de fibroblastos humanos. Las cuatro proteínas Oct4, Sox2, c-Myc y Klf4, con una cola de nueve residuos de arginina, para facilitar su entrada en las células blanco (técnica conocida como CPP: *cell penetrating peptide*) fueron sobre-expresadas en la línea celular HEK293 y obtenidas a partir de allí, para la transformación de los fibroblastos humanos (13). Las células madre pluripotentes humanas, inducidas por proteínas (hpiPS), muestran características muy semejantes a las *hESCs*, se han mantenido en cultivo por más de 35 pasajes, y han mostrado la capacidad de diferenciarse a células de las tres capas germinales tanto *in vitro* como *in vivo*, en la formación de teratomas en ratones desnudos (13).

Aunque las proteínas recombinantes son menos eficientes en la inducción de la reprogramación celular, que las técnicas basadas en la utilización de virus (0,006 vs 0,067 %), las piPS, han pasado todas las pruebas de pluripotencia tanto *in vivo* como *in vitro*, e incluso se ha reportado recientemente que las iPS de ratón, no solo son capaces de generar quimeras, sino ratones adultos y fértiles, en ensayos de complementación tetraploide (35). No es posible establecer por técnicas similares, por restricciones de carácter ético, si las hpiPS poseen un nivel similar de pluripotencia.

### Papel de los factores de reprogramación

La publicación de los resultados del grupo de Takahashi y Yamanaka, en el 2006, presentando evidencia de que un grupo de cuatro factores de transcripción, Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc, eran suficientes para reprogramar fibroblastos murinos y generar células con un fenotipo similar a las ESCs, a las cuales ellos denominaron “células stem pluripotentes inducidas, iPS”, causó un gran impacto en la comunidad científica en el campo de las células madre. La regulación del estado de pluripotencia está mediada principalmente por Oct4, Sox2 y Nanog. Estos factores de transcripción conforman una intrincada red de interacciones a través de la formación de heterodímeros que actúan

sobre los promotores de los genes blanco, induciendo la expresión de genes que promueven la pluripotencia e inhibiendo genes que median la diferenciación, además de regular su propia expresión (36).

**Oct4** (Pou5f1). Pertenece a la familia de factores de transcripción Oct (octámero) y juega un papel clave en el mantenimiento de la pluripotencia. La deficiencia de Oct4 en embriones es letal y aunque hay formación del trofoblasto, la masa celular interna del blastocisto no se desarrolla (37). Niveles elevados por el contrario, inducen la diferenciación (38). De ahí que los niveles de expresión de Oct4 necesiten estar sometidos a una estricta regulación.

**Sox2**. Coopera activamente con Oct4 en la regulación de genes implicados en el mantenimiento de la pluripotencia como Nanog, Fgf4, osteopontina y Lefty (39), pero a diferencia de Oct4 no se expresa solamente en células pluripotentes sino que también lo hace en etapas tardías del desarrollo, especialmente en células madre neuronales (40). Análisis recientes por inmunoprecipitación de cromatina, seguidos por análisis por microarreglos de promotores han revelado que cerca de 400 promotores pueden estar co-ocupados por Oct4, Sox2 y Nanog (41). Es llamativo que aunque estos datos apuntan a señalar a Oct4, Sox2 y Nanog como genes maestros en la regulación de la pluripotencia, dentro del grupo de factores de reprogramación de Yamanaka, no se encuentra Nanog como un gen necesario para la inducción de la reprogramación de las iPS. Esto podría explicarse por lo menos en parte, primero porque una de las consecuencias inmediatas de la expresión ectópica de Oct4 es la inducción de la expresión de Nanog y segundo porque Nanog parece estar más involucrado como un “determinante de la capacidad de reprogramación, que como un determinante de la pluripotencia” (42).

**Klf4**. Es un miembro de la familia de factores de transcripción Kruppel-like que se expresa en ESCs y parece tener un doble papel como oncogén y antioncogén. Su papel en el proceso de reprogramación parece estar relacionado con la inhibición de p53, previniendo la salida de las células del ciclo celular y contrarrestando la acción de c-Myc en la inducción de la apoptosis y la diferenciación (43).

**c-Myc**. Es un factor de transcripción con múltiples dominios y un potente oncogén, implicado en la proliferación celular, la replicación del ADN, la inhibición

de la diferenciación celular y la metástasis (43). Aunque se ha demostrado que c-Myc no es indispensable para la reprogramación celular, su presencia sí influye de manera significativa en la cinética y la eficiencia del proceso (44;45). Se ha propuesto que el papel de c-Myc puede estar relacionado con la inducción de un programa celular necesario para la autorrenovación y/o por la inducción de modificaciones epigenéticas que promuevan la de-diferenciación o bloqueen la diferenciación (46).

### Moléculas pequeñas

La eventual utilización clínica de las iPS tiene todavía varios problemas, entre ellos la baja eficiencia en su obtención y principalmente, la manipulación genética para la inducción de la expresión ectópica de los factores de reprogramación. Es por esto que varios grupos se han enfocado en la utilización de compuestos químicos, denominados genéricamente “moléculas pequeñas” para reemplazar la utilización de virus y aumentar la eficiencia en la generación de células pluripotentes.

BIX-01294 (BIX), es un inhibidor de la G9a metiltransferasa de las histonas, que aumenta la eficiencia de la reprogramación de células progenitoras neuronales, transducidas solo con Oct4/Klf4, hasta niveles comparables a los obtenidos utilizando los cuatro factores de reprogramación (47). Basados en la observación de que uno de los primeros cambios que sufren los fibroblastos es un cambio en la morfología que los asemeja a células epiteliales, además de la inducción de la expresión de la E-cadherina (marcador epitelial), el grupo de Sheng Ding propone que vías de señalización implicadas en la transición mesenquimo-epitelial, como TGFβ y MEK-ERK, además de factores que puedan favorecer la supervivencia celular deberían tener un gran efecto en la reprogramación. Para probar esta hipótesis, utilizaron tres moléculas pequeñas, en diferentes combinaciones, para tratar fibroblastos humanos transducidos con los cuatro factores de reprogramación: SB431542 un inhibidor de ALK5 (uno de los receptores del TGFβ), PD0325901 (inhibidor de la vía MEK-ERK) y Thiazovivin, que aumenta la supervivencia celular después de la tripsinización. De esta manera logran un aumento de 200 veces en la eficiencia de la reprogramación (48). Otro estudio reciente que demuestra que la reprogramación de queratinocitos humanos es al menos 100 veces más eficiente que la de fibroblastos, apoya esta visión (49).

Una de las moléculas pequeñas más prometedoras en el proceso de reprogramación celular es el ácido valpróico (VPA), un inhibidor de las deacetilasas de las histonas, que permite la reprogramación de fibroblastos humanos y de ratón sin utilizar c-Myc (50), o de fibroblastos humanos utilizando solamente Oct4 y Sox2 (51). Todos estos estudios hacen prever que en un futuro próximo se podrán desarrollar protocolos que permitan la obtención de iPS de una manera más eficiente y que puedan aplicarse clínicamente de manera segura.

### Modelos de generación de células iPS

La generación de células iPS mediante la transducción retroviral de los ahora denominados “factores de reprogramación de Yamanaka”, es un proceso que ha podido ser reproducido en varios laboratorios, pero una de las mayores limitaciones sigue siendo la baja eficiencia, la cual puede variar entre el 0,001 y el 0,1 %, dependiendo del sistema utilizado (49). Varios grupos han reportado además, que de la población de células aparentemente pluripotentes que se obtiene inicialmente después de la transducción retroviral, una gran proporción está solamente parcialmente reprogramada y que ellas dependen de la expresión sostenida de los transgenes para adquirir la capacidad de autorrenovación (28). Se han propuesto varias posibilidades para explicar la baja eficiencia del procedimiento: rata baja de infectividad y de integración retroviral, heterogeneidad en la integración de los retrovirus que puede resultar en una gran variabilidad en la expresión de los transgenes tanto cuantitativa como temporalmente, la integración de los retrovirus o de los lentivirus puede alterar la expresión de uno o más factores esenciales para la inducción de la pluripotencia, así como diferencias intrínsecas de los diferentes tipos de células que se quieren reprogramar (49;52). Recientemente se ha reportado que los queratinocitos humanos son 50-100 veces más susceptibles a la reprogramación que los fibroblastos y que estas diferencias no se deben a diferencias en la infectividad de los retrovirus, ya que un porcentaje similar de células de los dos tipos, infectadas con un retrovirus control que expresan el gen reportero GFP (proteína verde fluorescente) (49). Además, estas diferencias en la eficiencia de la reprogramación no se observan cuando se utiliza un sistema de transducción de lentivirus inducible con doxiciclina (53).

Shinya Yamanaka ha propuesto recientemente dos modelos de generación de células pluripotentes a

partir de células somáticas: el modelo “*Élite*” y el modelo “*Estocástico*” (28). El modelo *élite* asume que solo una pequeña fracción de la población de células somáticas es susceptible de ser reprogramada. Este modelo a su vez podría subdividirse en un modelo “*élite predeterminado*” y un modelo “*élite inducido*”. En el modelo *élite predeterminado* las células competentes para la reprogramación serían células madre y/o células progenitoras presentes en la población de células somáticas y que se encuentran normalmente formando parte de los tejidos adultos. Sin embargo, el hecho de que la eficiencia de la reprogramación sea altamente dependiente del método utilizado, no parece apoyar este modelo. Así por ejemplo, simplemente aumentando el tiempo de selección de las iPS en cultivo, Yamanaka ha incrementado hasta 10 veces la eficiencia de la obtención de iPS a partir de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) (28). Se ha reportado que hasta el 10% de los MEF pueden ser reprogramados cuando se los trata con los factores de reprogramación más ácido valpróico (VPA), un inhibidor de las deacetilasas de histonas (17). De tal manera que aún si los factores de reprogramación y/o los compuestos químicos o moléculas pequeñas como se les ha denominado, actuaran preferencialmente induciendo la reprogramación de células madre u otra subpoblación de células inmaduras, es muy poco probable que esta subpoblación comprenda un 10% de un cultivo primario de fibroblastos. El modelo *élite inducido* asume que la reprogramación depende de la activación o inactivación de ciertos factores no identificados hasta ahora, como resultado de la integración viral durante la transducción de los factores de reprogramación. Sin embargo, la evidencia sugiere que la integración viral no requiere de sitios específicos para que la reprogramación celular se lleve a cabo y se ha demostrado que iPS derivadas de hepatocitos, fibroblastos y células gástricas de ratón, no muestran sitios comunes de integración retroviral (54). Por otra parte, la generación de iPS, sin el uso de vectores retrovirales (proteína recombinantes y/o moléculas pequeñas) tampoco apoya este modelo.

El modelo *estocástico* por su parte propone que la mayoría, si no todas las células somáticas tienen la capacidad de ser reprogramadas a células iPS. De acuerdo con Yamanaka, la diferenciación celular podría describirse como “una bola rodando cuesta abajo por la pendiente de una colina epigenética, pasando por un estado pluripotencial y descendiendo hasta un estado de compromiso de linaje”. Dos requisitos son

necesarios para que la célula pueda ser reprogramada: 1) Que los factores de reprogramación se expresen siguiendo un patrón que dirija la célula en la dirección apropiada, “colina arriba”. Dado que en este momento, desconocemos esos patrones y la manera de regularlos, este primer requisito solo se cumple al azar. 2) Las células deben permanecer bloqueadas por una barrera epigenética, en el estado pluripotente, aún cuando la expresión de los transgenes haya desaparecido. Ya que los factores de reprogramación por sí mismos no pueden constituir esa barrera epigenética, se requieren otra serie de eventos estocásticos para la generación de una célula iPS, de una manera similar a como ocurre en la reprogramación nuclear por SCNT, en la cual la metilación del ADN y las modificaciones de las histonas juegan un papel fundamental (28). Hanna y col., presentan evidencia experimental reciente de que la reprogramación es un evento estocástico, altamente dependiente de la tasa de proliferación celular y que la mayoría de los fibroblastos de ratón tienen la capacidad de ser reprogramados a iPS, en un proceso que puede ser acelerado por la inhibición de la vía p53/p21 o la sobreexpresión de Lin28 o Nanog (55).

### Identificación de las células pluripotentes

Otro problema que se origina en la baja eficiencia de la reprogramación y en el hecho de que algunas de las células somáticas estén solo parcialmente reprogramadas, es el de definir criterios confiables para identificar las células que realmente han alcanzado la pluripotencia. En algunos estudios reportados, las iPS han sido aisladas basándose en criterios morfológicos y de algunos marcadores como la expresión de la fosfatasa alcalina, Nanog, SSEA-3, SSEA-4 y TRA-1-160 (8;56). En una publicación reciente, el grupo de George Daley, del Instituto de Células Stem de Harvard y del *Children’s Hospital* de Boston, implementan la técnica de “imágenes en vivo” que se basa en la tinción con Hoechst y en el análisis a través del tiempo, de la expresión de varios marcadores de pluripotencia, para identificar líneas *bona fide* iPS, obtenidas a partir de fibroblastos humanos, mediante transducción retroviral de Oct-4, Sox-2, Klf-4 y c-Myc, lo que les permite definir 3 tipos de colonias que se generan durante el proceso de reprogramación: colonias de tipo I, que corresponden a células pequeñas, densamente empaquetadas, Hoeschst<sup>bright</sup> (con una coloración Hoeschst brillante) y SSEA-4<sup>-</sup> y TRA-1-160<sup>-</sup>. Colonias tipo II, SSEA-4<sup>+</sup>, TRA-1-160<sup>-</sup> y que permanecen Hoeschst<sup>bright</sup> y colonias tipo III, SSEA-4<sup>+</sup>, TRA-1-160<sup>+</sup>, Nanog<sup>+</sup>, Hoeschst<sup>dim</sup> y

alta celularidad (como un indicativo de la capacidad de proliferación/o ausencia de senescencia). Las colonias de tipo I no formaron teratomas *in vivo* en ratones desnudos (la prueba considerada como “gold standard” de la pluripotencia) o formaron tumores pobremente diferenciados, mientras que solo algunas colonias tipo II y todas las colonias tipo III formaron teratomas con células de las tres capas germinales. Además, solo las colonias tipo III mostraron la hipometilación de los promotores Oct-4 y Nanog, característica de las células pluripotentes. Por lo tanto, solo las colonias tipo III pueden ser definidas como verdaderas células pluripotentes, iPS (57). Estos resultados recalcan la necesidad de utilizar criterios de expresión génica, epigenéticos y de teratogénesis, si se quiere estar razonablemente seguros de contar con verdaderas células pluripotentes. Así por ejemplo, análisis amplios de los patrones de metilación permiten establecer patrones diferenciales y distinguir entre ESCs, células tumorales, células pluripotentes iPS y los fibroblastos a partir de los cuales estas últimas fueron generadas (58). Aunque la tecnología de las iPS es aún muy reciente, dado su enorme potencial, es urgente seguir explorando nuevas estrategias para su generación de una manera más eficiente y segura.

### El futuro de las iPS

La producción de hiPS con características genéticas y funcionales muy similares a las de las hESCs ha generado grandes expectativas en la comunidad científica, ofreciendo la posibilidad de generar iPS paciente-específicas, con una metodología más asequible, permitiendo una transición mucho más rápida hacia las aplicaciones clínicas y la medicina regenerativa y sin los cuestionamientos éticos de las hESCs por no tener que destruir un embrión. El disponer de líneas hiPS permitirá también otras aplicaciones en el campo de la medicina del siglo XXI:

1. *El diseño de terapias más seguras utilizando hiPS.* Es necesario desarrollar protocolos para la correcta caracterización y aislamiento de líneas celulares completamente reprogramadas y caracterizadas. Por otra parte es necesario también establecer su estabilidad genómica y cromosómica y protocolos adecuados de diferenciación a los linajes celulares requeridos para terapias específicas y evaluar su potencial teratogénico (59).
2. *Desarrollar modelos in vitro para el estudio de las bases celulares y moleculares de diversas enferme-*



dades. Así lo demuestran los avances en Parkinson (34), diabetes (30),  $\beta$  Talasemia y anemia de Fanconi (60), y enfermedades cardiovasculares (61-63), entre otras. Park y col., reportan la generación de iPSs a partir de pacientes con una variedad de enfermedades genéticas tanto de herencia mendeliana simple como compleja: la deficiencia de adenosin deaminasa (ADA) relacionada con inmunodeficiencia combinada severa, la enfermedad de Parkinson, el síndrome de Shwachman-Bodian-Diamond, la enfermedad de Gaucher tipo III, la distrofia muscular de Duchenne, la enfermedad de Huntington, la diabetes mellitus tipo I, el síndrome de Down, y el síndrome de Lesch-Nyhan (64). Una reciente revisión de Saha y Jaenisch, analiza los retos técnicos que deben ser superados para la utilización de las iPS como modelos celulares para enfermedades. Destacan por ejemplo, la necesidad de generar iPS sin modificar el genoma de las células blanco para evitar interferencias, desarrollar estrategias eficientes para la corrección de los defectos genéticos y definir los modelos de enfermedades relevantes, tanto para los estudios *in vitro* como *in vivo* (65).

3. Disponer de modelos *in vitro* para ensayos farmacológicos y diseño de nuevos medicamentos (66;67).
4. Establecer modelos para el estudio de la diferenciación celular (68-71).

Es importante mencionar también que las iPS pueden obtenerse a partir de una variedad de células somáticas como queratinocitos (72), células de sangre periférica (73), células hepáticas (54), células  $\beta$  del páncreas (30), abriendo de esta manera un mayor espectro de posibilidades. La generación de líneas celulares pluripotentes paciente-específicas a partir de las cuales se pueda generar cualquier linaje celular que se requiera, representa una oportunidad única para el tratamiento de múltiples enfermedades, de una manera eficiente y segura. Sin embargo, aún se requiere seguir investigando sobre los mecanismos moleculares que controlan la diferenciación celular y cómo prevenir la formación de tumores después del trasplante. Una de las mayores preocupaciones de los investigadores en el campo de la terapia celular es que las células madre transplantadas puedan generar neoplasias (59,74). Esta preocupación se ve reforzada por un reporte reciente del primer caso documentado de un tumor derivado del trasplante de células madre. Un niño con Ataxia Telangiectasia, recibió varios trasplantes intracerebrales de células

madre neuronales fetales, en un hospital de Moscú, y cuatro años después se detectaron masas tumorales en el cerebro y la médula espinal. Los análisis moleculares y de inmunotipificación demostraron que los tumores provenían de las células transplantadas (75).

El campo de la investigación con las iPS está avanzando a pasos agigantados, a pesar de lo cual aún quedan muchos interrogantes por resolver: ¿Qué tan semejantes o qué tan diferentes son las iPS de las ESCs? ¿Cuál es la real pluripotencia de las hiPS? ¿Varían las características de las iPS dependiendo de la célula somática de la cual se obtienen? ¿Es segura la terapia celular mediante el trasplante de iPS? El resolver estos y otros interrogantes necesita todavía tiempo y un gran esfuerzo de los investigadores. El primer paso es sin embargo, disponer de líneas de iPS, correctamente caracterizadas.

## Conclusiones

La posibilidad de reprogramar células somáticas y obtener células con características similares a las ESCs, permite abordar problemas fundamentales de la biología del desarrollo y la diferenciación celular. Por otra parte, ofrece una herramienta única para el estudio de las bases moleculares y celulares de múltiples enfermedades, el desarrollo de modelos *in vitro* para estudios farmacológicos y eventualmente, la obtención de células paciente-específicas para tratamientos de terapia celular. Sin embargo, queda todavía mucho camino por recorrer y se requiere de grandes esfuerzos de la comunidad científica para resolver las dudas respecto a la pluripotencia celular y los mecanismos moleculares que la regulan e implementar protocolos para la generación más eficiente y segura de líneas celulares iPS perfectamente caracterizadas. Estos son sin duda, retos emocionantes y dado el ritmo vertiginoso de los avances en el campo de las iPS, es de esperar en un futuro próximo, desarrollos importantes para la biología y la medicina del nuevo milenio.

## Referencias

1. Ramalho-Santos, M., and Willenbring, H. 2007. On the origin of the term "stem cell". *Cell Stem Cell* 1:35-38.
2. Merchant, A.M., and Flake, A.W. 2004. Surgeons and stem cells: a pragmatic perspective on shifting paradigms. *Surgery* 136:975-980.
3. Rosenthal, N. 2003. Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *N. Engl. J. Med.* 349:267-274.

4. Ratajczak, M.Z., Zuba-Surma, E.K., Wysoczynski, M., Wan, W., Ratajczak, J., Wojakowski, W., and Kucia, M. 2008. Hunt for pluripotent stem cell -- regenerative medicine search for almighty cell. *J. Autoimmun.* 30:151-162.
5. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145-1147.
6. Kastenberg, Z.J., and Odorico, J.S. 2008. Alternative sources of pluripotency: science, ethics, and stem cells. *Transplant. Rev. (Orlando)* 22:215-222.
7. Takahashi, K., and Yamanaka, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.
8. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861-872.
9. Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., ntosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R. et al 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917-1920.
10. Johnson, B.V., Shindo, N., Rathjen, P.D., Rathjen, J., and Keough, R.A. 2008. Understanding pluripotency--how embryonic stem cells keep their options open. *Mol. Hum. Reprod.* 14:513-520.
11. Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., and Yanagimachi, R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394:369-374.
12. 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* 385:810-813.
13. Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R. et al 2009. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4:472-476.
14. Zhou, H., Wu, S., Joo, J.Y., Zhu, S., Han, D.W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y. et al 2009. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4:381-384.
15. Li, W., Wei, W., Zhu, S., Zhu, J., Shi, Y., Lin, T., Hao, E., Hayek, A., Deng, H., and Ding, S. 2009. Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 4:16-19.
16. Amabile, G., and Meissner, A. 2009. Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol. Med.* 15:59-68.
17. Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A. 2008. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat. Biotechnol.* 26:795-797.
18. Briggs, R., and KING, T.J. 1952. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 38:455-463.
19. Gurdon, J.B. 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10:622-640.
20. Hochedlinger, K., and Plath, K. 2009. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 136:509-523.
21. Bru, T., Clarke, C., McGrew, M.J., Sang, H.M., Wilmut, I., and Blow, J.J. 2008. Rapid induction of pluripotency genes after exposure of human somatic cells to mouse ES cell extracts. *Exp. Cell Res.* 314:2634-2642.
22. Hansis, C., Barreto, G., Maltry, N., and Niehrs, C. 2004. Nuclear reprogramming of human somatic cells by xenopus egg extract requires BRG1. *Curr. Biol.* 14:1475-1480.
23. Taranger, C.K., Noer, A., Sorensen, A.L., Hakelien, A.M., Boquest, A.C., and Collas, P. 2005. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell* 16:5719-5735.
24. Cowan, C.A., Atienza, J., Melton, D.A., and Eggan, K. 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 309:1369-1373.
25. Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. 2001. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr. Biol.* 11:1553-1558.
26. Tada, M., and Tada, T. 2006. Nuclear reprogramming of somatic nucleus hybridized with embryonic stem cells by electrofusion. *Methods Mol. Biol.* 329:411-420.
27. Yu, J., Vodyanik, M.A., He, P., Slukvin, I.I., and Thomson, J.A. 2006. Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion. *Stem Cells* 24:168-176.
28. Yamanaka, S. 2009. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 460:49-52.
29. Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., and Yamanaka, S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures. *Nat. Protoc.* 2:3081-3089.
30. Stadtfeld, M., Brennand, K., and Hochedlinger, K. 2008. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr. Biol.* 18:890-894.
31. Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. 2008. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322:949-953.
32. Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M. et al 2009. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458:766-770.
33. 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* 458:771-775.
34. Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M. et al 2009. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136:964-977.
35. Boland, M.J., Hazen, J.L., Nazor, K.L., Rodriguez, A.R., Gifford, W., Martin, G., Kupriyanov, S., and Baldwin, K.K. 2009. Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature* 461:91-94.
36. Wagner, R.T., and Cooney, A.J. 2009. OCT4: less is more. *Cell Res.* 19:527-528.
37. Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:379-391.
38. Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24:372-376.
39. Beltrami, A.P., Cesselli, D., and Beltrami, C.A. 2009. Pluripotency rush! Molecular cues for pluripotency, genetic reprogramming of adult stem cells, and widely multipotent adult cells. *Pharmacol. Ther.* 124:23-30.
40. Miyagi, S., Nishimoto, M., Saito, T., Ninomiya, M., Sawamoto, K., Okano, H., Muramatsu, M., Oguro, H., Iwama, A., and

- Okuda, A. 2006. The Sox2 regulatory region 2 functions as a neural stem cell-specific enhancer in the telencephalon. *J. Biol. Chem.* 281:13374-13381.
41. Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., and Orkin, S.H. 2008. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* 132:1049-1061.
  42. Gokhale, P.J., and Andrews, P.W. 2008. New insights into the control of stem cell pluripotency. *Cell Stem Cell* 2:4-5.
  43. Welstead, G.G., Schorderet, P., and Boyer, L.A. 2008. The reprogramming language of pluripotency. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 18:123-129.
  44. Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. 2008. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat. Biotechnol.* 26:101-106.
  45. Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P., and Jaenisch, R. 2008. c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2:10-12.
  46. Knoepfler, P.S. 2008. Why myc? An unexpected ingredient in the stem cell cocktail. *Cell Stem Cell* 2:18-21.
  47. Shi, Y., Do, J.T., Despoints, C., Hahm, H.S., Scholer, H.R., and Ding, S. 2008. A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2:525-528.
  48. Lin, T., Ambasudhan, R., Yuan, X., Li, W., Hilcove, S., Abujarour, R., Lin, X., Hahm, H.S., Hao, E., Hayek, A. et al 2009. A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat. Methods* 6:805-808.
  49. Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G. et al 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* 26:1276-1284.
  50. Yamanaka, S. 2008. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell Prolif.* 41 Suppl 1:51-56.
  51. Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. 2008. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat. Biotechnol.* 26:1269-1275.
  52. Sridharan, R., and Plath, K. 2008. Illuminating the black box of reprogramming. *Cell Stem Cell* 2:295-297.
  53. Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., and Hochedlinger, K. 2008. A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3:340-345.
  54. Aoi, T., Yae, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., Okita, K., Takahashi, K., Chiba, T., and Yamanaka, S. 2008. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321:699-702.
  55. Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van, Z.J., Lengner, C.J., Creighton, M.P., van, O.A., and Jaenisch, R. 2009. Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*.
  56. Park, I.H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W., and Daley, G.Q. 2008. Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451:141-146.
  57. Chan, E.M., Ratanasirintawoot, S., Park, I.H., Manos, P.D., Loh, Y.H., Huo, H., Miller, J.D., Hartung, O., Rho, J., Ince, T.A. et al 2009. Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat. Biotechnol.* 27:1033-1037.
  58. Doi, A., Park, I.H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M.J., Irizarry, R., Herb, B., Ladd-Acosta, C., Rho, J., Loewer, S. et al 2009. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat. Genet.* 41:1350-1353.
  59. Carpenter, M.K., Frey-Vasconcelos, J., and Rao, M.S. 2009. Developing safe therapies from human pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* 27:606-613.
  60. Ye, L., Chang, J.C., Lin, C., Sun, X., Yu, J., and Kan, Y.W. 2009. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 106:9826-9830.
  61. Nelson, T.J., Ge, Z.D., Van, O.J., Barron, M., Rudy-Reil, D., Hacker, T.A., Misra, R., Duncan, S.A., Auchampach, J.A., and Lough, J.W. 2006. Improved cardiac function in infarcted mice after treatment with pluripotent embryonic stem cells. *Anat. Rec. A Discov. Mol. Cell Evol. Biol.* 288:1216-1224.
  62. Tulloch, N.L., Pabon, L., and Murry, C.E. 2008. Get with the (re)program: cardiovascular potential of skin-derived induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118:472-475.
  63. Yamada, S., Nelson, T.J., Crespo-Diaz, R.J., Perez-Terzic, C., Liu, X.K., Miki, T., Seino, S., Behfar, A., and Terzic, A. 2008. Embryonic stem cell therapy of heart failure in genetic cardiomyopathy. *Stem Cells* 26:2644-2653.
  64. Park, I.H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M.W., Cowan, C., Hochedlinger, K., and Daley, G.Q. 2008. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134:877-886.
  65. Saha, K., and Jaenisch, R. 2009. Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell* 5:584-595.
  66. Yokoo, N., Baba, S., Kaichi, S., Niwa, A., Mima, T., Doi, H., Yamanaka, S., Nakahata, T., and Heike, T. 2009. The effects of cardioactive drugs on cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*
  67. Tanaka, T., Tohyama, S., Murata, M., Nomura, F., Kaneko, T., Chen, H., Hattori, F., Egashira, T., Seki, T., Ohno, Y. et al 2009. In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 385:497-502.
  68. Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A. et al 2009. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461:402-406.
  69. Narazaki, G., Uosaki, H., Teranishi, M., Okita, K., Kim, B., Matsuoka, S., Yamanaka, S., and Yamashita, J.K. 2008. Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118:498-506.
  70. Senju, S., Haruta, M., Matsunaga, Y., Fukushima, S., Ikeda, T., Takahashi, K., Okita, K., Yamanaka, S., and Nishimura, Y. 2009. Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27:1021-1031.
  71. Taura, D., Sone, M., Homma, K., Oyamada, N., Takahashi, K., Tamura, N., Yamanaka, S., and Nakao, K. 2009. Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells—brief report. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29:1100-1103.
  72. Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G. et al 2008. Efficient and rapid generation of induced pluripotent

- stem cells from human keratinocytes. *Nat. Biotechnol.* 26:1276-1284.
73. Loh, Y.H., Agarwal, S., Park, I.H., Urbach, A., Huo, H., Heffner, G.C., Kim, K., Miller, J.D., Ng, K., and Daley, G.Q. 2009. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood* 113:5476-5479.
74. Tenzen, T., Zembowicz, S and Cowan, C.A. 2010. Genome modification of human embryonic stem cells. *J Cell Physiol* 222:278-281.
75. Amariglio, N., Hirshberg, A., Scheithauer, B.W., Cohen, Y., Loewenthal, R., Trakhtenbrot, L., Paz, N., Koren-Michowitz, M., Waldman, D., Leider-Trejo, L. et al 2009. Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS. Med.* 6:e1000029.