

Las células troncales pluripotenciales en la terapia celular

Pluripotent stem cells on cell therapy

J.A. Gámez Escalona¹, N. López Moratalla²

RESUMEN

Las células con pluripotencialidad inducida (iPS) son un nuevo tipo de célula troncal derivada de células somáticas humanas, mediante reprogramación con factores de transcripción. Estas células iPS tienen características de las células troncales embrionarias, como la capacidad de convertirse en todos los tipos de células diferenciadas del organismo. A corto plazo, las células de pacientes reprogramadas están siendo útiles para crear modelos celulares de enfermedades, en las que estudiar los procesos patológicos y probar fármacos. A pesar de algunas críticas, se ha ido acumulando evidencia en los trabajos preclínicos, sobre la efectividad de la terapia celular con los clones de iPS apropiadamente seleccionados. La generación de células iPS ha propiciado el desarrollo de otras técnicas, como por ejemplo, la transdiferenciación por la que se convierte directamente in vivo fibroblastos cardiacos en miocitos. Este tipo celular pluripotencial es de un gran valor en la investigación biomédica y abre nuevas posibilidades a la terapia celular.

Palabras claves. Células troncales. Pluripotencialidad inducida (iPS). Modelos celulares de enfermedad. Reprogramación. Terapia celular.

ABSTRACT

Induced pluripotent stem (iPS) cells are a novel stem cell population derived from human somatic cells through reprogramming using a set of transcription factors. These iPS cells were shown to share the characteristics of embryonic stem cells, including the ability to give rise to differentiated cells of every tissue type of the body. In the shorter term, iPS cells will be useful for creating patient-identical disease model cells in which the pathological process can be studied and drugs can be tested. Despite critical attitudes, accumulating preclinical evidence supports the effectiveness of iPSC-based cell therapy on the selection of appropriate iPSC clones. The production of iPS cells has also spurred the development of other techniques, for example, transdifferentiation by researchers can now convert heart fibroblasts directly in vivo into myocytes by similar methods. This pluripotent cells is indeed of great value in medical research and it is opening new possibilities in cell therapy.

Key words. Stem cells. Induced pluripotent stem (iPS) cells. Disease model cells. Reprogramming. Cell therapy

An. Sist. Sanit. Navar. 2014; 37 (1): 129-136

1. Universidad de Monteávil. Caracas
2. Universidad de Navarra. Pamplona

Recepción: 4 de septiembre de 2013
Aceptación provisional: 2 de octubre de 2013
Aceptación definitiva: 7 de octubre de 2013

Correspondencia:

JA Gámez Escalona
Universidad de Monteávil.
Caracas
jgamez@uma.edu.ve

LOS INICIOS DE LA TERAPIA CELULAR EN 2006

Las células troncales de adulto, presentes en todos los órganos, tejidos y sistemas, constituyen una reserva orgánica cuya función natural es la regeneración de las células diferenciadas destruidas por enfermedad o accidente. La Medicina Regenerativa trata de encontrar el modo de potenciar *in vitro* su función natural y, en el futuro, conseguir ese objetivo sin manipularlas fuera del organismo.

A medida que aumenta el grado de diferenciación de las células troncales –pluripotenciales, multipotenciales o progenitoras disminuye la capacidad proliferativa característica de las células indiferenciadas–. Resultaron, por ello, las células de las reservas del organismo muy escasas para investigar sus propiedades, en vistas a su uso terapéutico. Por esto, desde hace cerca de 10 años se busca “rejuvenecer” células de adulto, llevándolas en dirección contraria a la del desarrollo embrionario, hasta alcanzar el estado pluripotencial¹, en el que no están totalmente comprometidas hacia una línea celular concreta.

El interés por el fenómeno de la pluripotencialidad proviene del aislamiento y la derivación de las células troncales de origen embrionario². Sin embargo, el avance de los trabajos para conocer los mecanismos de este fenómeno vino con la obtención de células con pluripotencialidad inducida –iPS, por sus siglas en inglés *Induced Pluripotent Stem*– de ratón en 2006³, y en humanas en 2007, por el mismo equipo de Yamanaka⁴ y el de Thomson⁵. También en 2007 se publicó la primera prueba de uso terapéutico de iPS, en ratones a los que se les había inducido una anemia⁶.

Superados los inconvenientes de la tecnología usada –transferencia de genes mediante un vector viral⁷ siendo uno de ellos el oncogen *Myc*⁸–, que comprometía la seguridad en caso de aplicaciones clínicas⁹, tiene lugar en menos de 5 años un despliegue de conocimientos sin precedentes en la biología de las células troncales¹⁰.

Se logran iPS de diversos tejidos incluso de donantes enfermos¹¹ –por ejemplo de

pacientes con atrofia muscular¹²– lo que aporta un material de enorme valor para conocer los mecanismos moleculares de diversas enfermedades y diseñar y probar terapias y fármacos con modelos celulares humanos¹³. La necesidad de modelos humanos es evidente; adipocitos¹⁴ y cardiomiocitos¹⁵ han sido los primeros modelos conseguidos.

En esos años, el equipo de Melton inicia la proeza de conseguir rejuvenecer o diferenciar las células *in vivo*¹⁶; una estrategia diferente con los mismos objetivos: conseguir una mayor cantidad de células troncales de la reserva natural para terapias regenerativas. Células troncales como los fibroblastos se han podido convertir *in vitro* a células somáticas tales como células neurales¹⁷, hepatocitos¹⁸, miocitos cardíacos¹⁹, y células progenitoras hematopoyéticas²⁰. Los conocimientos del proceso de desdiferenciación-rediferenciación a través de la reprogramación al estado pluripotencial ayudará, sin duda, a la reprogramación directa *in situ*, transdiferenciación, probablemente el mejor sistema para la Medicina Regenerativa.

LA PLURIPOTENCIALIDAD CELULAR

Tres líneas de investigación inspiraron el descubrimiento de la reprogramación hacia atrás con las iPS²¹: la reprogramación celular por transferencia nuclear, iniciada por John Gurdon en 1962, que mostró la posibilidad de dar marcha atrás en el proceso de diferenciación. El descubrimiento de los factores de transcripción a partir de los experimentos de Schneuwly desde 1987, esenciales para conocer el mecanismo de la des-diferenciación, y los trabajos de aislamiento y cultivo de células troncales pluripotenciales de origen embrionario, que comenzaron con la primera obtención de las de ratón en 1981.

Los numerosos intentos de reprogramar hacia atrás el núcleo de una célula somática transfiriéndola a un oocito²², sugerían la existencia de una combinación de factores en los óvulos y/o en las células embrionarias capaces de des-diferenciar una célula madura. En el momento en que el equipo de Yamanaka comienza su estudio se cono-

cían unos 24 factores de la pluripotencialidad²³. En cinco años definen los factores necesarios para inducir la reprogramación²⁴. El desarrollo de las iPS se presenta, por tanto, como un ensayo bioquímico de la pluripotencialidad. Las modificaciones cualitativas y cuantitativas sobre este ensayo experimental van revelando mecanismos bioquímicos y genéticos, hasta ahora ignorados. Citamos algunos avances:

- Una mayor comprensión de la Epigenética, paradigma esencial de la Biología Celular y del Desarrollo, al conocer la regulación de la represión/expresión de los factores de transcripción que comprometen a linajes celulares específicos. Aunque se conocía²⁵ que algunas células quedan reprogramadas solo parcialmente por esta falta de regulación, se avanza en el conocimiento de los mecanismos de la plasticidad celular.
- Un mejor conocimiento de los RNA reguladores implicados en la optimización del proceso de inducción de la pluripotencialidad²⁶, así como de las vías de señalización²⁷.
- Es de interés, dada la similitud que existe entre los procesos de transcripción de las células troncales pluripotenciales y la transformación tumoral, averiguar cuáles son los genes clave que mantienen a las células protegidas de los elementos que pueden inducir su des-diferenciación. Posiblemente se descubran nuevos supresores de tumores²⁸, que modulan la estabilidad de la célula diferenciada.
- Las iPS pueden aportar también nuevos conocimientos a los fundamentos moleculares de la generación de los tumores de células germinales ya que los tumores de células germinales tienen una batería de factores de transcripción similar al de las iPS²⁹.

LA INVESTIGACIÓN DE LA PLURIPOTENCIALIDAD INDUCIDA

La obtención de las iPS es un proceso clonal y por eso las características de los clones obtenidos por diversos métodos y

en diversos laboratorios difieren entre sí. Se hizo preciso establecer cuáles serían los clones que asegurarían la diferenciación total, lógicamente imprescindible para poder avanzar en su posible uso en Medicina Regenerativa. Se llevó a cabo un gran trabajo para purificar correctamente y evaluar la efectividad y seguridad los miles de clones y subclones de iPS existentes. Además, el proceso de inducción del estado pluripotencial en las células es muy poco eficaz, muy lento, y la reprogramación es parcial. Se han ofrecido varias explicaciones, lo que va dando lugar a conocer paulatinamente algo más de los mecanismos de la programación y reprogramación celular³⁰, de gran valor biomédico³¹.

Un aspecto controvertido ha sido el estándar mediante el que se evalúa la pluripotencialidad³², tanto en el caso de los estudios de este fenómeno como para las posibles aplicaciones terapéuticas. La experiencia acumulada con las células troncales procedentes de embriones hizo que muchos plantearan como exigencia que éstas fueran el control para evaluar las iPS; sin embargo, se ha podido demostrar que hay diferencias en la expresión génica entre ambos tipos de células pluripotenciales³³ en la metilación del ADN, clave en la regulación epigenética durante la maduración de las células pluripotenciales³⁴. Por el contrario, otros laboratorios mostraron que muchos de los clones derivados de las embrionarias o de las iPS se superponen en la expresión génica³⁵.

Otro aspecto importante de discusión ha sido la capacidad de las células iPS para diferenciarse. Se planteó llevarlo a cabo también por comparación de las derivadas de éstas con las derivadas de las células procedentes de los embriones, que serían el control.

Un criterio clave para conocer la capacidad de diferenciación es la posibilidad de asociación espontánea como cuerpos embrioides; este tipo de estructuración celular permite una diferenciación regional en la que se pueden distinguir, mediante marcadores moleculares, células pertenecientes a las tres capas germinales; dicha capacidad la presentan también las iPS, como se

puso de manifiesto en 2007³⁶. Es más, el hecho de que en las iPS persistan marcadores de la línea de la célula somática de la que se originó³⁷, permitió conocer que al menos algunos clones de iPS, alcanzaban la pluripotencialidad diferenciándose hacia atrás, esto es, a un estado más inmaduro, pero sin llegar al estado embrionario.

La eficacia de la diferenciación ha resultado muy variable³⁸, como era de esperar puesto que la célula iPS resultante es de por sí variable, lo cual se debe, como se indica más arriba, a que la inducción de la pluripotencialidad es un proceso clonal. Actualmente se persigue la identificación de un patrón de expresión genética y epigenética que defina la reprogramación total de ambos tipos de células pluripotenciales para disponer de una prueba objetiva para el análisis de las líneas celulares que se generen desde ellas³⁹.

El marcado carácter ético con que el pionero de las iPS, Yamanaka, llevó a cabo sus trabajos le llevó a buscar estrategias que evitaran el uso como controles de las células procedentes de embriones. Por una parte, cuando el proceso de rediferenciación de células pluripotenciales de ratón puede ser extrapolable a células humanas, la comparación entre células embrionarias e iPS quedó resuelto con los marcadores de la diferenciación de las líneas celulares murinas. Así ocurrió con las células de la retina generadas a partir de iPS⁴⁰. Por otra parte, realizó en colaboración con el equipo de Jaenisch, la trayectoria de cambio de marcadores durante el desarrollo embrionario murino mediante una original estrategia consistente en examinar las proteínas de membrana de las células presentes a lo largo del proceso espacio-temporal del desarrollo⁴¹.

Algunos autores señalaron que estas células contienen defectos, como mutaciones somáticas⁴², variaciones del número de copias⁴³, e inmunogenicidad⁴⁴, entre otros. Sin embargo, y especialmente en las obtenidas de enfermos, las alteraciones parecen estar en la célula somática original, y por tanto son defectos de la célula original y no del proceso mismo de la reprogramación, como se publicó en 2011⁴⁵, aspecto

éste que es clave en la búsqueda de modelos celulares de enfermedad humana.

A 2013, el interés en generar iPS, en el que la pluripotencialidad se puede obtener por factores de transcripción-transducción desde células somáticas, se ha incrementado rápidamente⁴⁶, ya que se prevé que abrirán una gran cantidad de oportunidades en la biomedicina. Los peligros de esta tecnología que acabamos de señalar relacionados con la seguridad de la terapia no tienen apoyo en los estudios preclínicos que muestran la eficacia. Los estudios iniciales requerirán trasplante de estas células en animales inmunodeficientes, con la subsiguiente observación a largo plazo.

AVANCES EN LA APLICACIÓN TERAPÉUTICA DE LAS CÉLULAS CON PLURIPOTENCIALIDAD INDUCIDA

La reprogramación de células somáticas tanto *in vitro* como *in vivo* supone ya, de hecho, un avance para el estudio de diversas enfermedades.

A corto plazo las iPS suponen la posibilidad de disponer de modelos para la investigación que conduce al descubrimiento de drogas específicas, toxicología y farmacología predictiva, como recoge el artículo de Yamanaka, ya citado, de 2012 sobre el presente y futuro de estas células. A más largo plazo se prevé poder usarlas en sustitución de células dañadas.

La experimentación animal se viene realizando con éxito, lo que da expectativas a una cierto largo plazo. Los avances se centran en el tratamiento de la enfermedad Parkinson⁴⁷, la deficiencia de plaquetas⁴⁸, la lesión de la médula espinal⁴⁹ y la degeneración macular⁵⁰. En Japón esta tecnología recibe un impulso clave con la aprobación del primer ensayo clínico mediante el uso de las iPS para el tratamiento de la degeneración macular⁵¹. En diciembre de 2012 se prueba con éxito la recuperación de la lesión de la médula espinal en marmotas con células troncales neurales derivadas de iPS humanas⁵².

Los modelos celulares para el estudio de enfermedades, tanto de los mecanismos

de la enfermedad como de la investigación de nuevos potenciales tratamientos, avanzan con la enfermedad de Alzheimer⁵³ y la esquizofrenia⁵⁴. Otros modelos se dirigen a enfermedades genéticas, como el síndrome CINCA⁵⁵, infecciosas como la hepatitis C utilizando iPS infectadas con el virus⁵⁶. Para algunas enfermedades hematológicas las iPS como la anemia de Falconi han mostrado no solo servir para establecer modelos celulares de estudio de la enfermedad, sino que además han proporcionado una posibilidad de tratamiento mediante la generación de líneas celulares libres de enfermedad. De esta forma se muestra que las iPS pueden tener también un gran potencial terapéutico⁵⁷. En cada caso es necesario examinar qué parte del desarrollo *in vivo* puede ser recapitulado en el modelo celular de la enfermedad.

La infertilidad o la esterilidad causadas por la alteración o la ausencia de células germinales permanecen incurable en gran medida. Para el estudio de los mecanismos moleculares que la originan, y el desarrollo de fármacos para su posible tratamiento, se requieren células germinales humanas. En 2012 un equipo liderado por Yamanaka, ha conseguido presentar un modelo de enfermedad consistente en la producción de células germinales por inducción de pluripotencialidad a partir de células somáticas del paciente⁵⁸. De nuevo el planteamiento ético del pionero Yamanaka encauza el posible uso de las iPS para manipulación de la reproducción humana hacia una rigurosa investigación de la infertilidad⁵⁹.

También en 2012 consiguen una nueva estrategia de reprogramar fibroblastos cardíacos *in vivo* mediante terapia genética⁶⁰, de gran interés. Como es conocido, la enfermedad cardíaca es la principal causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo y los enfoques terapéuticos actuales para la insuficiencia cardíaca son limitados debido a que los cardiomiocitos postnatales tienen poca capacidad regenerativa. Se había tratado de incorporar por ingeniería genética el factor de crecimiento endotelial vascular⁶¹ que induce angiogénesis⁶² sin éxito, y también incorporar la ATPasa dependiente de calcio del retículo sarcoplás-

mico que mejora el manejo del calcio en los cardiomiocitos⁶³.

Una nueva estrategia para restaurar el número de las células diana es su conversión directa de otros tipos de células. Dos grupos informaron a principios del 2012 de la conversión *in vivo* de los fibroblastos cardíacos en miocitos⁶⁴, por introducción de un combinado de genes de los factores adecuados. Y posteriormente se publica otro conjunto de genes que permiten a los fibroblastos convertirse *in vivo* en cardiomiocitos más maduros⁶⁵. Queda mucho por mejorar la técnica pero el panorama de la reprogramación *in vivo* empieza a dilatarse.

Por último, señalamos los avances más recientes dirigidos a conseguir bancos de células pluripotenciales capaces de diferenciarse a cualquiera de los tipos que forman el cuerpo humano, de forma no sean rechazadas inmunológicamente por el paciente. Preparar para cada paciente las células que se necesiten a partir del rejuvenecimiento de las suyas, es largo, laborioso y costoso. Es necesario lograr un sistema de suministro de células pluripotenciales. Recientemente, el gobierno japonés ha aprobado a Yamanaka la creación de líneas celulares a partir de los miles de muestras de sangre del cordón umbilical guardadas⁶⁶. Se pretende de crear, para el 2020, un conjunto estándar de 75 líneas de células iPS que son suficientes como para poder ser toleradas sin rechazo por el 80% de la población japonesa. La mayoría de los bancos iPS de otros países se especializan en células de enfermos para la investigación.

BIBLIOGRAFÍA

1. YAMANAKA S. A Fresh Look at iPS Cells. *Cell* 2009; 137: 13-17.
2. THOMSON A, ISKOVIT-ELDOR J, SHAPIRO S. S. Embryonic stem line derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145-1147.
3. TAKAHASHI K, YAMANAKA S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cells* 2006; 126: 663-676.
4. OKITA K, ICHISAKA T, YAMANAKA S. Generation of germ line-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448: 313-317.

5. YU J, VODYANIK MA, SMUGA-OTTO K, ANTOSIEWICZ-BOURGET J, FRANE JL, TIAN S et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318:1917-1920.
6. HANNA J, WERNIG M, MARKOULAKI S, SUN CW, MEISSNER A, CASSADY JP et al. Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 2007; 318: 1920-1923.
7. KAJI K, NORRBY K, PACA A, MILEIKOVSKY, M, MOHSENI P, WOLTJEN K. Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors *Nature* 2009; 458: 771-775.
8. NAKAGAWA M, KOYANAGI M, TANABE K, TAKAHASHI K, ICHISAKA T, AOI T et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology* 2008; 26:101-106.
9. PERA MF. Low-risk reprogramming. *Nature* 2009; 458: 715-716.
10. FUCHS E. The impact of cell culture on stem cell research. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 640-641.
11. PARK IH, ARORA N, HUO H, MAHERALI N, AHFELDT T, SHIMAMURA A et al. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008; 134: 877-886.
12. EBERT AD, YU J, ROSE FF, MATTIS VB, LORSON CL, THOMSON JA. Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 2009; 457: 51-61.
13. YAMANAKA S. Patient-specific pluripotent stem cells become even more accessible. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 1-2.
14. TAURA D, NOGUCHI M, SONE M, HOSODA K, MORI E, OKADA Y et al. Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: Comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Letters* 2009; 583: 1029-1033.
15. ZHANG J, WILSON G, SOERENS A, KOONCE C, YU J, PALECEK S et al. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circulation Research* 2009; 104: E30-E41.
16. ZHOU Q, BROWN J, KANAREK A, RAJAGOPAL J, MELTON DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to b-cells. *Nature* 2008; 455: 627-633.
17. VIERBUCHEN T, OTERMEIER A, PANG ZP, KOKUBO Y, SUDHOF TC, WERNIG M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 2010; 463: 1035-1041.
18. HUANG P, HE Z, JI S, SUN H, XIANG D, LIU C et al. Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature* 2011; 475: 386-389.
19. IEDA M, FU JD, DELGADO-OLGUIN P, VEDANTHAM V, HAYASHI Y, BRUNEAU B et al. Direct Reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 2010; 142: 375-386.
20. SZABO E, RAMPALLI S, RISUEÑO R, SCHNERCH A, MITCHELL R, FIEBIG-COMYN A et al. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature* 2010; 468: 521-526.
21. YAMANATA S, BLAU HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 2010; 465: 704-712.
22. EGGAN K, TACKETT M, BALDWIN K, OSBORNE J, GOGOS J, CHESSE A et al. Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature* 2004, 428: 44-49.
23. TAKAHASHI K. Direct reprogramming. *Dev Growth & Differ* 2010; 52: 319-333.
24. ZHANG XY, YAMANAKA S, KIM S, MIURA K, IWAO H. NAT1, a homologue of the eukaryotic translation initiation factor 4G, is essential for cell differentiation and mouse development. *Jpn J Pharmacol* 1999; 79: 163P.
25. MIKKELSEN T S, HANNA J, ZHANG X, KU M, WERNIG M, SCHORDERET P et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 2008; 454: 49-54.
26. JUDSON R, BABIARZ J, VENERE M, BLELLOCH R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nature Biotechnology* 2009; 27:459-461.
27. GASPAR-MAIA A, ALAJEM A, POLESSO F, SRIDHARAN R, MASON M, HEIDERSBACH A et al. Chd1 regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 2009; 460: 863-U97.
28. WANG Y, ARMSTRONG S. Cancer: inappropriate expression of stem cell programs? *Cell Stem Cell* 2008; 2: 297-299.
29. BLELLOCH R, VENERE M, YEN J, RHAMALO-SANTOS M. Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *cell stem Cell* 2007; 1: 245-247.
30. YAMANAKA S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 2009, 460: 49-50.
31. YAMANAKA S. Induced pluripotent stem cells: past, present and future. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 678-684.
32. MAHERALI N, HOCHEDLINGER K. Guidelines and techniques for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2008; 3: 595-605.
33. CHIN M, MASON M, XIE W, VOLINIA S, SINGER M, PETERSON C et al. Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 2009; 5: 111-123.

34. DOI A, PARK IH, WEN B, MURAKAMI P, ARYEE M, IRIZARRY R et al. Differential methylation of tissue and cancerspecific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nature Genetics* 2009; 41: 1350-1353.
35. GUENTHER M, FRAMPTON G, SOLDNER F, HOCKEMEYER D, MITALIPOVA M, JAENISCH R et al. Chromatin structure and gene expression programs of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 249-257.
36. ITSKOVITZ-ELDOR J, SCHULDINER M, KARSENTI D, EDEN A, YUHUKA O, AMIT M et al. Differentiation of human embryonic stem cell into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 2000; 6: 88-95.
37. GHOSH Z, WILSON K, WU Y, HU S, QUERTERMOUS T, WU J. Persistent donor cell gene expression among human induced pluripotent stem cells contributes to differences with human embryonic stem cells. *PLoS ONE* 2010; 5: 1-10.
38. BOULTING G, KISKINIS E, CROFT G, AMOROSO M, OAKLEY D, WAINGER B et al. A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 2011; 29: 279-283.
39. KISKINIS E, EGGAN K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 2010; 120: 51-59.
40. HIRAMI Y, OSAKADA F, TAKAHASHI K, OKITA K, YAMANAKA S, IKEDA H et al. Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neuroscience Letters* 2009; 458: 126-131.
41. AIBA K, NEDEREZOV T, PIAO Y, NISHIYAMA A, MATOBA R, SHAROVA L et al. Defining developmental potency and cell lineage trajectories by expression profiling of differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Research* 2009; 16: 73-80.
42. GORE A, LI Z, FUNG HL, YOUNG J, AGARWAL S, ANTOSIEWICZ-BOURGET J et al. Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 471: 61-67.
43. HUSSEIN S, BATADA N, VUORISTO S, CHING R, AUTIO R, NÄRVA E et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 2011; 471: 58-62.
44. ZHAO T, ZHANG ZN, RONG Z, XU Y. Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 474: 212-215.
45. QUINLAN A, BOLAND M, LEIBOWITZ M, SHUMILINA S, PEHRSON S, BALDWIN K et al. Genome sequencing of mouse induced pluripotent stem cells reveals retroelement stability and infrequent dna rearrangement during reprogramming. *Cell Stem Cell* 2011; 9: 366-373.
46. OKANO H, NAKAMURA M, YOSHIDA K, OKADA Y, TSUJI O et al. Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem. *Cells Circ Res* 2013; 112: 523-533.
47. POLITIS M, LINDVALL O. Clinical application of stem cell therapy in Parkinson's disease. *BMC Medicine* 2012; 10: 1-7.
48. TAKAYAMA N, NISHIMURA S, NAKAMURA S, SHIMIZU T, OHNISHI R, ENDO H et al. Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *J Exp Med* 2010; 207: 2817-2830.
49. NORI S, OKADA Y, YASUDA A, TSUJI O, TAKAHASHI Y, KOBAYASHI Y et al. Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *Proc Nat Acad Sci* 2011; 108: 16825-16830.
50. OKAMOTO S, TAKAHASHI M. Induction of retinal pigment epithelial cells from monkey iPS cells. *Invest Opthh Vis Sci* 2011; 52: 8785-8790.
51. CYRANOSKI D. Stem cells cruise to clinic. *Nature* 2013; 494: 413.
52. KOBAYASHI Y, OKADA Y, ITAKURA G, IWAI H, NISHIMURA S, YASUDA A et al. Pre-evaluated safe human ipsc-derived neural stem cells promote functional recovery after spinal cord injury in common marmoset without tumorigenicity. *PLoS ONE* 2012; 7: e52787.
53. ISRAEL M, YUAN S, BARDY C, REYNA S, MU Y, HERRERA C et al. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 2012; 482: 216-220.
54. BRENNAND K, SIMONE A, JOU J, GELBOIN-BURKHART C, TRAN N, SANGAR S et al. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 2011; 473: 221-225.
55. TANAKA T, TAKAHASHI K, YAMANE M, TOMIDA S, NAKAMURA S, OSHIMA K, et al. Induced pluripotent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *BLOOD* 2012; 120: 1299-1308.
56. SI-TAYEB K, DUCLOS-VALLÉE JC, PETIT, MA. Hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells (iHLCs) are permissive to hepatitis C virus (HCV) infection: HCV study gets personal. *J Hepat* 2012; 57: 689-691.
57. RAYA Á, RODRÍGUEZ-PIZA I, GUENECHEA G, VASSENA R, NAVARRO S, BARRERO M et al. Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi

- anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 2009; 460: 53-59.
58. HAYASHI Y, SAITOU M, YAMANAKA S. Germline development from human pluripotent stem cells toward disease modeling of infertility. *Fertil Steril* 2012; 97: 1250-1259.
 59. LÓPEZ-MORATALLA N. ¿Resucitan al inicio del 2009 las células troncales procedentes de embriones? *Cuadernos de Bioética* 2009; 70: 471-486.
 60. YOSHIDA Y, YAMANAKA S. An emerging strategy of gene therapy for cardiac Disease. *Circ Res* 2012; 111: 1108-1110.
 61. LOSORDO DW, VALE PR, SYMES JF, DUNNINGTON CH, ESAKOF DD, MAYSKY M et al. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998; 98: 2800-2804.
 62. ISNER JM, PIECZEK A, SCHAINFELD R, BLAIR R, HALEY L, ASAHARA T, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996; 348: 370-374
 63. JESSUP M, GREENBERG B, MANCINI D, CAPPOLA T, PAULY DF, JASKI B, YAROSHINKY A, ZSEBO KM, HAJJAR RJ. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation* 2011; 124: 304-313.
 64. QIAN L, HUANG Y, SPENCER CI, FOLEY A, VEDANTHAM V, LIU L et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature* 2012; 485: 593-598.
 65. INAGAWA K, MIYAMOTO K, YAMAKAWA H, MURAOKA N, SADAHIRO T, UMEI T et al. Induction of cardiomyocyte-like cells in infarct hearts by gene transfer of Gata4, Mef2c, and Tbx5. *Circ Res* 2012; 111: 1147-1156.
 66. CYRANOSKI D. Stem-cell pioneer banks on future therapies. *Nature* 2012; 488: 139.