

CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS Y CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUCIDAS: ¿PASADO, PRESENTE Y/O FUTURO EN LA MEDICINA REGENERATIVA?

EMBRYONIC STEM CELLS AND INDUCED PLURIPOTENT CELLS: PAST, PRESENT AND/OR FUTURE IN THE REGENERATIVE MEDICINE?

José Luis Cortés* y José Luis García-Pérez. Banco Andaluz de Células Madre. Centro de Investigación Biomédica. Universidad de Granada. Campus de la Salud. Granada.

*e-mail: jlcortes@fundacionhvn.org

RESUMEN

Actualmente, los estudios en medicina regenerativa están dirigidos a la investigación y conocimiento de las células pluripotentes inducidas (iPSCs). Para algunos, son las células llamadas a coger el relevo de las células madre embrionarias (ESCs), que hasta hace poco fueron el objetivo principal de investigación en este campo de la biomedicina. Un análisis de las ventajas e inconvenientes de cada tipo de células, así como un estudio de los factores que las limitan, es necesario para establecer una visión real de las expectativas creadas, que sigue siendo la aplicación de este tipo de células en terapia celular. Rev Asoc Est Biol Rep 2011; 16(1):55-61.

Palabras clave: células madre embrionarias, células pluripotentes inducidas, diferenciación, medicina regenerativa, pluripotente, reprogramación

SUMMARY

At present, most regenerative medicine studies are centered in the use of induced pluripotent stem cells (iPSCs). According to some of them, these cells represent the substitute of embryonic stem cells (ESCs), which until recently were the main research objective in Biomedicine. A critical analysis of the advantages and disadvantages of each cell type is truly needed for the establishment of a real view of the great expectative generated: their application in cellular replacement therapies. Rev Asoc Est Biol Rep 2011; 16(1):55-61.

Key words: embryonic stem cell, induced pluripotent cells, differentiation, regenerative medicine, pluripotent, reprogramming

ESCALADO IMPACIENTE DE LA CIENCIA

Cuando los niños van a la escuela y asisten a las clases de matemáticas, raro es el maestro que no aconseja aprender esta asignatura peldaño a peldaño, como si de una escalera se tratara, haciendo énfasis en que si se falla en la asimilación o base de conceptos, es posible que tengan que subir esa escalera imaginaria de una manera menos firme, y la progresión del niño comience a fallar.

Con la Investigación Biomédica no pasa lo mismo. Es muy frecuente que antes de adquirir los conocimientos plenos sobre algunos tipos de comportamientos moleculares, celulares o incluso tisulares que ocurren en nuestro organismo, la Ciencia de un paso más allá, creándose nuevas perspectivas y vías de investigación que, en muchos casos, dan giros radicales en los enfoques originados inicialmente.

Respecto a las investigaciones en Medicina Regenerativa y sus posibles aplicaciones, sobre todo en el campo del trasplante alogénico y autogénico, tenemos uno de los mejores ejemplos. Nos referimos a las investigaciones con células madre embrionarias humanas (hESCs), y su intento de sustitución por las células pluripotentes inducidas (iPSCs), originadas a partir de células diferenciadas, y que soportan una carga ética y moral menor que las primeras.

CÉLULAS MADRE, TRONCALES O STEM CELLS

A pesar de su diferente origen, todas las células troncales, o células madre, comparten una serie de características comunes, si bien pueden expresarlas en distintos grados (Liew et al., 2005):

- **Indiferenciación:** las células madre son células indiferenciadas que no poseen

las características fenotípicas propias de los tipos celulares diferenciados que integran los diferentes tejidos de un organismo adulto. Presentan una morfología redondeada o fusiforme y carecen de estructuras citoplasmáticas peculiares (citoesqueleto desarrollado, predominio específico de algunos orgánulos, diferenciaciones de membrana, etc.) que son propias de los tipos celulares diferenciados que integran los distintos órganos.

- **Capacidad de autopertuación:** las células madre o troncales tienen capacidad para perpetuarse, mediante divisiones mitóticas que originan nuevas células, de características similares. A través de este proceso, una célula madre puede proliferar para dar lugar a una numerosa población de células troncales. Igualmente, un conjunto limitado de células madre, en el seno de un determinado tejido u órgano, puede mantener su número o incrementarlo

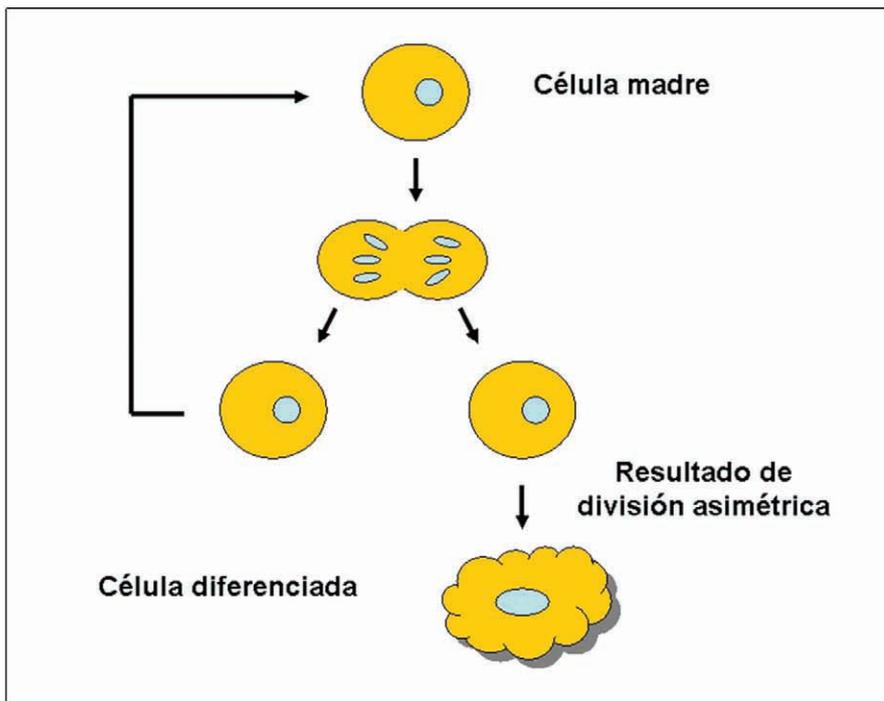


Figura 1: Comportamiento de una célula madre tras una división simétrica y asimétrica (Imagen tomada del Banco Andaluz de Células Madre [BACM]).

ante necesidades específicas, aún cuando tales células estén participando en un proceso de regeneración tisular.

- **Posibilidad de diferenciación:** las células troncales pueden, ante determinadas condiciones experimentales o de forma natural *in vivo*, abandonar su estado indiferenciado y transformarse, mediante un proceso de diferenciación, en alguno de los tipos celulares adultos, propios de los distintos tejidos y órganos. De este modo, pueden dar lugar a células nerviosas, cardíacas, secretoras o sanguíneas, adquiriendo las características morfológicas y funcionales propias de estos tipos celulares. Esta posibilidad, junto con su capacidad de proliferación, es lo que convierte a las células madre en una fuente importante para la obtención de tipos celulares, facultándolas para tratar mediante terapia regenerativa las alteraciones que se producen en algunos tipos de enfermedades.

Las características antes mencionadas dibujan un esquema (Figura 1), como un microchip en blanco, capaz de ser programado para la realización de una función determinada y con la posibilidad de contar previamente con una gran cantidad de ellos de forma natural, antes de iniciar la programación correspondiente. Son, sin duda, estas características las que han hecho fijar en las células madre el centro de atención de la biomedicina actual.

CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS

Desde que se obtuvieron los primeros cultivos de células embrionarias de ratón derivadas de blastocistos en 1981 (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981), se sentaron las bases para el desarrollo de las metodologías necesarias que conducirían más tarde a generar células embrionarias humanas con características similares a las del ratón.

A estas células embrionarias aisladas se las denominó células madre o troncales embrionarias (ESCs, por *Embryonic Stem Cells*). Cuando en noviembre de 1998, el grupo estadounidense liderado por James Thomson publicó los primeros datos sobre la derivación de líneas de células madre embrionarias humanas (hESCs) a partir de blastocistos en fase de preimplantación (Figura 2), se abrió una nueva puerta de esperanza para la curación de numerosas enfermedades hasta ahora incurables (Thomson et al., 1998). Este grupo consiguió 5 líneas de hESCs a partir de 14 masas celulares internas (ICM), mediante la técnica de inmunocirugía (Solter y Knowles, 1975), y utilizando un cultivo sobre fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs). Todas las líneas fueron caracterizadas mediante métodos fenotípicos y genotípicos, confirmando entre otras características la capacidad de diferenciación de estas células hESCs a cualquier tipo celular.

Además de su interés en Medicina Regenerativa, este tipo de células suponen una herramienta de enorme valor para el "screening" de nuevos fármacos, así como un modelo para estudiar la etiología de las enfermedades que tienen su origen durante la etapa embrionaria, y para estudiar procesos que ocurren durante el desarrollo embrionario humano (Menendez et al., 2006).

Las características esenciales que permiten que una célula se defina como

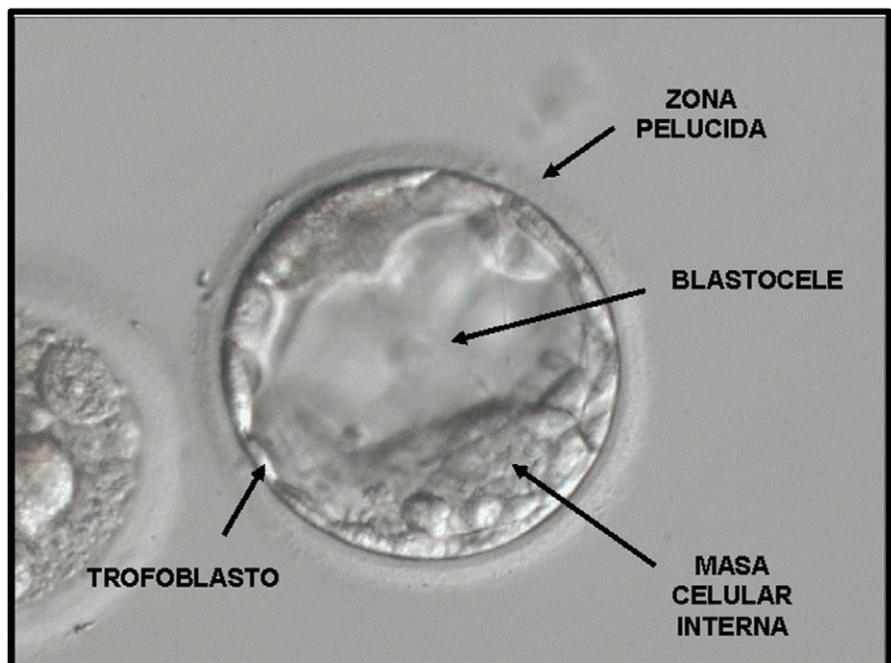


Figura 2: Ejemplo de blastocisto humano donde se detallan las diferentes partes del mismo, destacando la masa celular interna (ICM), de donde se obtiene las hESCs (Imagen tomada del BACM).

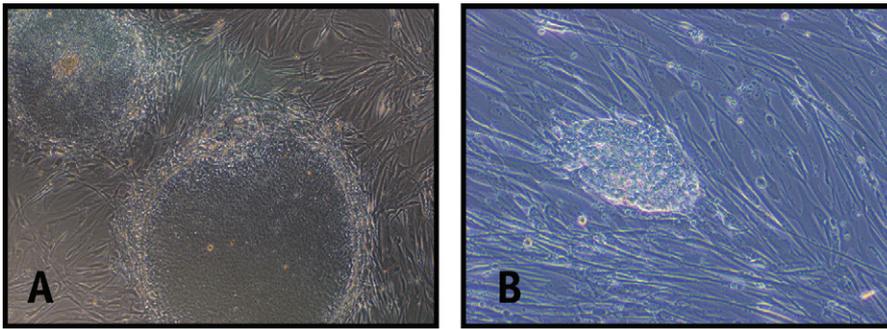


Figura 3: Ejemplos de colonias de (A) células madre embrionarias humanas (hESCs), y (B) células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). (Imágenes tomadas del BACM).

ESC se pueden reducir a las siguientes (Alonso-Bedate, 2004):

- 1) Se derivan de células de la MCI del blastocisto (Figura 2).
- 2) Son células diploides estables y poseen un cariotipo normal cuando se cultivan *in vitro*.
- 3) Se pueden propagar de forma indefinida en el estado embrionario y por tanto son capaces de experimentar un número ilimitado de divisiones simétricas sin diferenciarse (Figura 3A).
- 4) Se pueden diferenciar de forma espontánea para dar lugar a múltiples células que pertenecen a las tres capas de células germinales embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo).
- 5) Se pueden diferenciar tanto si son transplantadas a un embrión temprano como a uno tardío, es decir, son capaces de integrarse en todos los tejidos fetales durante el desarrollo.
- 6) Se pueden diferenciar *in vitro* de forma dirigida en las condiciones apropiadas.
- 7) Pueden dar lugar a cualquier célula del cuerpo adulto, incluso las células germinales, cuando colonizan un blastocisto huésped.
- 8) Tienen la capacidad de colonizar líneas germinales dando lugar a óvulos y espermatozoides y expresar el factor Oct-4.

Aunque todos estos requisitos son necesarios para definir con precisión el carácter troncal de una ESC, los elementos esenciales se pueden reducir a dos: que las ESC se puedan cultivar *in vitro* y que se puedan expandir de forma indefinida *in vitro* manteniendo el carácter indiferenciado característico de las células de las que se derivaron (Figura 1).

LIMITACIONES EN EL POTENCIAL DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Los estudios sobre células madre constituyen hoy en día uno de los temas más

controvertidos en el campo de las ciencias biomédicas. Por una parte han logrado motivar a la comunidad científica, y además han trascendido hasta el ámbito social, convirtiéndose en un objeto de atención generalizada. El alcance mediático de este tipo de investigaciones ha acaparado prensa, radio, televisión, e internet, aunque en muchas ocasiones la espectacularidad de las noticias ha abierto expectativas infundadas y en otras los planteamientos ideológicos han oscurecido la realidad de los logros.

Existen múltiples problemas conocidos que impiden prever qué enfermedades se beneficiarían de un posible uso de tejidos celulares derivados de las hESCs.

En primer lugar, la derivación de hESCs tiene un grado de eficacia muy bajo, siendo necesarios un gran número de embriones para poder conseguir líneas estables. De ahí que los últimos experimentos con este tipo de células estén encaminados al aumento de la eficacia en la derivación de dichas hESCs, teniendo en cuenta factores como la calidad del blastocisto, el método de derivación utilizado, e incluso la superficie de crecimiento utilizada (Cortes et al., 2009).

En segundo lugar, las hESCs forman teratomas al ser implantadas en estado indiferenciado en animales de laboratorio. Este problema desaparece si se implantan después de su diferenciación total, por lo que cualquier protocolo de transferencia de hESCs deberá incluir una diferenciación en su totalidad hacia el linaje de interés. Es importante resaltar que la existencia de hESCs indiferenciadas residuales promoverá la aparición de teratomas (Cortes et al., 2009).

Un tercer problema para la aplicación terapéutica de las hESCs reside en la dificultad de obtener células diferenciadas

a un linaje celular puro. Cuando se estimula su diferenciación, las hESCs son capaces de originar cualquier tipo celular, pero raramente lo hacen de manera homogénea y reproducible, sino que dan lugar a poblaciones de células en las que se mezclan distintos tipos especializados (Odorico et al., 2001; Wobus et al., 2001). Gracias a experimentos en células en cultivo y a modelos animales, hoy conocemos genes de diferenciación que controlan las vías de diferenciación. Por ejemplo, existen genes miogénicos que determinan la diferenciación hacia músculo (ej. Myo-D), neurogénicos que inducen la diferenciación hacia neuronas (ej. Sox-1), genes que determinan los distintos tipos celulares pancreáticos (ej. Pax4), etc. La activación controlada de genes de diferenciación en las hESCs podría producir el tipo celular deseado para cada aplicación (Wobus et al., 2001). El cuarto problema sería que las células implantadas podrían sufrir el mismo tipo de rechazo alógeno que se produce en el trasplante de órganos (Menendez et al., 2005). Para evitar esto, desde la primera derivación de hESCs en 1998, a fecha de hoy se han derivado más de 300 líneas hESCs en el mundo. Sin embargo, estudios recientes demuestran que la variabilidad genética de éstas no es muy alta (Mosher et al., 2010), limitando su posible uso en humanos por problemas de rechazo.

Teniendo en cuenta todas estas limitaciones, debido a su poder mediático y en Medicina Regenerativa, actualmente hay en curso al menos dos ensayos clínicos en EEUU que utilizan células derivadas de hESCs para curar enfermedades como la Distrofia Macular de Stargardt's o la parálisis de columna (<http://stemcells.nih.gov/info/health.asp>). En estos ensayos clínicos, será necesario comprobar que se trata de células funcionalmente activas, de manera que además de estudios de fenotipado y genotipado, será necesario realizar estudios de funcionalidad de estas células, ya que muchas de ellas pueden mantener cierto grado de inmadurez. Por otro lado, será necesario contar con la seguridad de que no quedan células indiferenciadas que, transferidas a un paciente, pudieran provocar teratomas (tumores germinales). Para esto ya se han realizado experimentos mediante la transfección de genes bajo el control de promotores específicos de hESCs y sensibles a antibióticos, de

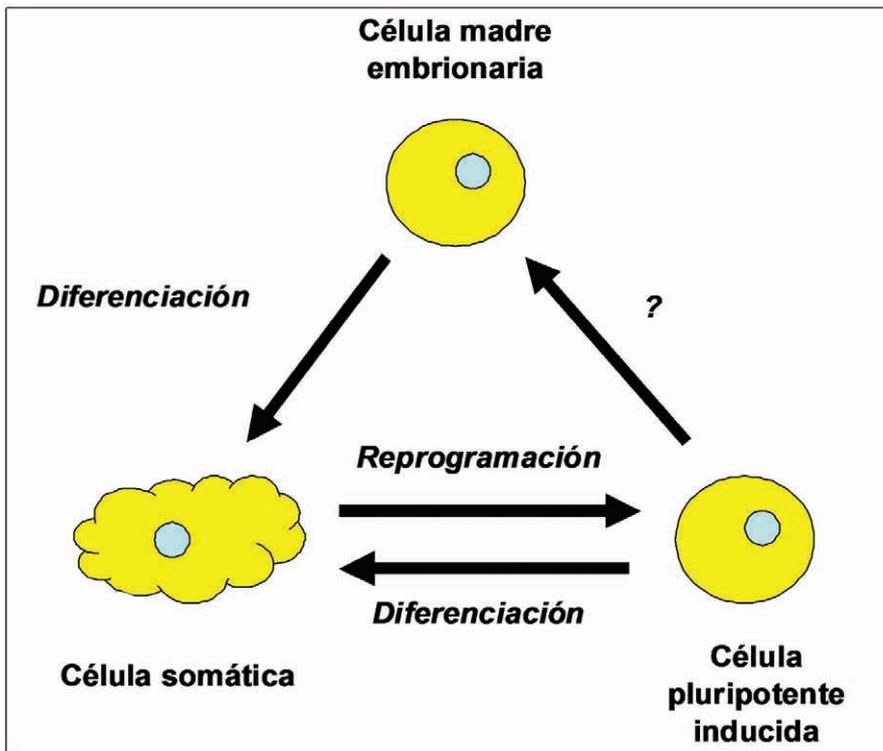


Figura 4: Comportamiento de una célula madre embrionaria tras diferenciación a célula somática y posibilidad de reprogramarse a célula pluripotente inducida, así como transdiferenciación posterior de estas células a otros tipos de células somáticas (Imagen tomada del BACM).

tal manera que, en presencia de éstos, las hESCs indiferenciadas residuales desaparecen (Schuldiner et al., 2003). También la separación celular se podría utilizar como una herramienta válida, aunque previamente sería necesario encontrar anticuerpos de membrana celular específicos para el tipo celular que queramos seleccionar.

Pero quizás, los aspectos que más afectan a las investigaciones con hESCs son los éticos y morales, debido a los sectores de la sociedad que no están de acuerdo con la destrucción de los embriones para utilizarlos en investigación. Este hecho hace que sea necesaria una gran regulación legislativa, no sólo a nivel nacional, sino a nivel europeo.

En España, actualmente, la Ley 14/2006, sobre técnicas de reproducción asistida, el Real Decreto 1301/2006, sobre células y tejidos humanos, y la Ley 14/2007, de investigación biomédica, constituyen la norma fundamental del ordenamiento jurídico en este ámbito de la asistencia y la investigación.

Del Instituto de Salud Carlos III depende la Comisión de Seguimiento y Control de donación y utilización de células

y tejidos humanos. En particular, le corresponde la emisión del informe relativo a los proyectos de investigación relacionados con la obtención, desarrollo y utilización de hESCs.

A nivel Europeo, se ha publicado la Directiva 2004/23/CE, de 31 de marzo, relativa al establecimiento de normas de calidad y de seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células y tejidos humanos. Esta Directiva se creó con la intención de unificar la diversidad de estándares presentes en los distintos países de la Unión Europea respecto a la importación/exportación de células y tejidos, la necesidad de incrementar la disponibilidad de células y tejidos donados y la efectividad de usarlos, así como eliminar los errores creados con unos sistemas de codificación y clasificación distintos entre centros y países europeos. En esta Directiva se engloban la mayoría de los tejidos y células humanas, las células reproductoras, tejidos fetales, así como las células madre adultas humanas (hASCs) y hESCs. En los primeros borradores de la Directiva se proponían unos requisitos de calidad importantes, sobre todo

con respecto a la calidad del aire tipo A de las salas donde se iban a manipular estos tejidos y células (salas GMP, siglas inglesas de *Good Manufacturing Practice*).

Debido a este punto, esta Directiva ha sido criticada por expertos en reproducción que declaran que las unidades de FIV no necesitan de tantas exigencias para poder realizar su trabajo, aunque de alguna manera no deja de ser una crítica pragmática, ya que parece encaminada a razones financieras y políticas (Mortimer, 2005). Si las clínicas de FIV tuvieran que ceñirse a tales exigencias, la inversión necesaria para adecuar los laboratorios a la nueva Directiva sería insostenible en la mayoría de los casos, llevando a la clínica al cese de sus actividades o encareciendo exhaustivamente los ciclos de FIV. Debido a estas críticas, la Unión Europea ha publicado la Directiva 2006/17/CE de la Comisión, de 8 de febrero de 2006, por la que se aplica la Directiva 2004/23/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a determinados requisitos técnicos para la donación, la obtención y la evaluación de células y tejidos humanos. En esta Directiva se matiza sobre la distinción entre laboratorios de reproducción asistida y laboratorios donde se derivan hESCs a partir de embriones humanos, siendo las propuestas menos exigentes con los primeros en lo referente a la calidad del aire (Cortés y Menéndez, 2009).

Conjuntamente con la legislación europea, existen iniciativas europeas importantes, financiadas parcialmente por el 7º Programa MARCO de la Comisión Europea, donde se busca dar transparencia a las hESCs respecto a las condiciones de almacenamiento y caracterización (*hESC Registry, Internacional Stem Cell Initiative, Stem Cell Banking Initiative*).

CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUCIDAS

En el año 2006, el grupo japonés de Shinya Yamanaka demostraba en ratón que la simple introducción de cuatro genes en células somáticas diferenciadas eran capaces de revertir todo el programa de diferenciación y reprogramar las células a un estadio embrionario (Takahashi y Yamanaka, 2006) (Figura 3B, 4). Estas células, denominadas iPSCs (por *induced pluripotent stem cells*), demostraron

su capacidad real como célula madre en experimentos de transferencia de blastocistos en ratón (Takahashi y Yamanaka, 2006). Dados los resultados de este estudio, estos descubrimientos tuvieron una importante repercusión mediática, y la producción de iPSCs fue considerada como el hallazgo más importante de la década por la prestigiosa revista Norteamericana *Science*. Quizás lo más importante en lo que refiere a Medicina Regenerativa, es que la metodología desarrollada por el grupo de Yamanaka fue utilizada por su grupo y otros para generar líneas iPSCs humanas (Lister et al., 2011). Por tanto, la generación de iPSCs a partir de células somáticas ofrece un inmenso potencial terapéutico, así como una herramienta para el estudio de enfermedades, desarrollo embrionario, *screening* de fármacos, etc.

Es importante señalar que el proceso de reprogramación por el cual una célula somática adquiere la pluripotencialidad no es una transformación genética, sino que consiste en una transformación epigenómica (Lister et al., 2011).

Como hemos dicho anteriormente, el origen de las iPSCs consiste en la introducción de cuatro genes en células somáticas. Los métodos más utilizados para ello son:

Realización de una transformación retroviral con los genes OCT-4, SOX2, KLF4 y MYC (Daley et al., 2009)

Realización de una integración lentiviral de los genes OCT-4, SOX2, NANOG y LIN28A (Yu et al., 2007).

Reprogramación sin la utilización de vectores episomales integrados. (Yu et al., 2009).

Actualmente, aunque la reprogramación puede ser inducida por los genes antes enumerados, constantemente están saliendo nuevos genes, como ESRRB y NR5A2, que realizando entre todos ellos combinaciones alternativas consiguen el establecimiento de nuevas iPSCs (Ichida et al., 2009). De igual forma, diversos tipos celulares han demostrado ser útiles en la reprogramación a iPSCs (fibroblastos, queratinocitos, células de la sangre, precursores neuronales, etc.) (Hanna et al., 2010).

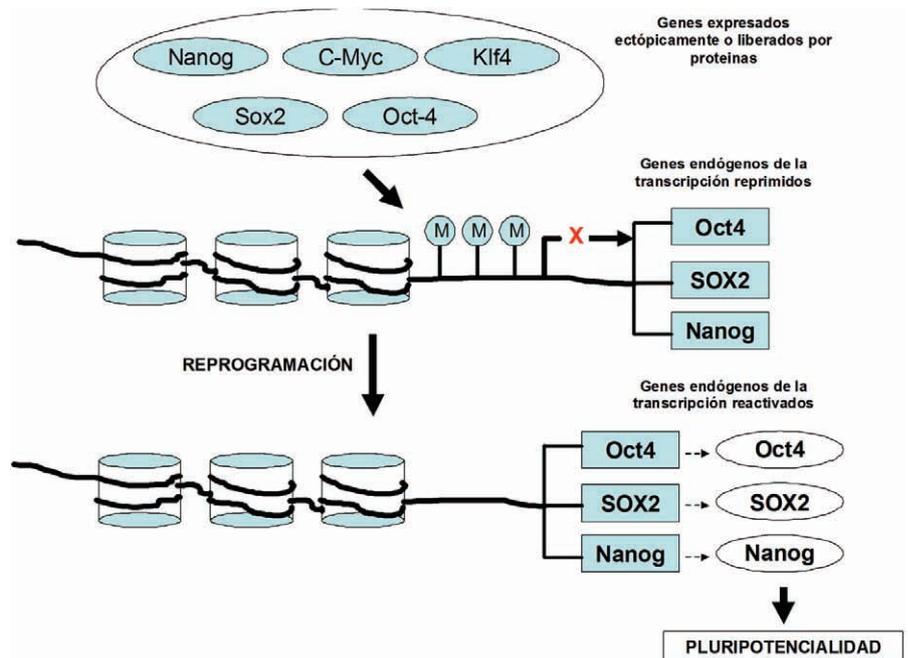


Figura 5: Esquema de una de las posibles trayectorias de reprogramación epigenética para conseguir la pluripotencia a partir células somáticas (Imagen tomada del BACM).

Por lo tanto, el proceso de reprogramación de células somáticas está acompañado por la remodelación de marcadores epigenéticos (Figura 5). En las células somáticas, los promotores de los genes antes mencionados están altamente metilados, reflejando su estado transcripcional reprimido. La formación de iPSCs conlleva la activación de estos genes, y su demetilación es usada como control de la reprogramación (Mikkelsen et al., 2008). En principio, la demetilación puede ocurrir mediante un mecanismo pasivo, produciéndose la inhibición de la DNA metiltransferasa 1 durante la replicación de DNA, o puede ocurrir mediante un mecanismo activo, donde la base metilada es reemplazada por DNA no replicativo. Una vez conseguidas las iPSCs, los estudios actuales se centran en las posibilidades de transdiferenciación a los distintos estados somáticos.

Precisamente en estos acontecimientos es donde encontramos las limitaciones de las iPSCs.

LIMITACIONES EN EL POTENCIAL DE LAS CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUCIDAS

En primer lugar, la generación de células iPSCs parece anular en gran medida la controversia generada en torno al uso de embriones humanos congelados, dado que no requieren el empleo de ningún material embrionario humano, por lo tanto no se

necesitan leyes y regulaciones específicas como es el caso de las hESCs. Además, teóricamente, el origen de líneas iPSCs, a partir de una célula somática de un individuo, facilitaría la aplicación de un trasplante autogénico, lo que hasta hace un tiempo se pensaba que sólo era posible utilizando las técnicas de transferencia nuclear, o mediante el empleo de células madre adultas.

Pero, la reprogramación de células somáticas implica la reconfiguración epigenómica, dotando a las iPSCs de características similares, pero parece ser que no idénticas, a las ESCs.

Actualmente, se están publicando trabajos donde se comprueba que existen diferencias, aunque mínimas, en la estructura de la cromatina y expresión de genes entre las hESCs y las iPSCs (Guenther et al., 2010). Por otro lado, se han visto diferencias epigenómicas entre los dos tipos celulares (Kim et al., 2010; Stadfeld et al., 2010), así como alteraciones en el potencial de diferenciación de las iPSCs, comparadas con las ESCs (Hu et al., 2010). Estos descubrimientos indican que existen diferencias fundamentales entre las ESCs y las iPSCs, formulándonos la pregunta de si realmente con las iPSCs se ha vuelto a caer en el error de lanzar grandes expectativas antes de tiempo, al igual que ocurrió a mediados de la pasada década con las ESCs (Hanna et al., 2010).

Más recientemente se han publicado varios artículos donde se demuestra a gran escala que los metilomas de las iPSCs y de las ESCs son muy similares, pero que existe una variabilidad epigenética significativa, y que las iPSCs conservan una “memoria”, traducida en diferencias entre las regiones metiladas, y que estas diferencias son transmitidas en alta frecuencia al proceder a la posterior diferenciación de las mismas (Lister et al., 2011). Además, se ha demostrado que durante el proceso de reprogramación se producen alteraciones genéticas, que aunque no muy severas, su repercusión en la funcionalidad de las iPSCs es desconocida (Hussein et al., 2011). Estos últimos descubrimientos han vuelto a dividir a la comunidad científica, formándose dos bandos: los que abogan por afirmar que estas diferencias no son tan importantes, y que merece la pena seguir invirtiendo en el estudio de las iPSCs, y otro bando donde se encuentran los defensores de la investigación con ESCs, con una defensa firme de la completa pluripotencialidad, e invirtiendo su tiempo en el control de la proliferación celular, uno de los factores limitantes para un futuro uso en trasplantes.

CONCLUSIONES

Volviendo al ejemplo de la escalera imaginaria de la clase de matemáticas, en la que debemos subir los peldaños uno a uno, pensamos que no es mala la idea de poner un pie en un peldaño, y otro en el siguiente, parándonos el tiempo suficiente y pensando bien cuando avanzar, dando un impulso mayor. De hecho, existen estudios en los que se recomienda la fusión de las células somáticas a reprogramar junto con ESCs, demostrándose una mejora en la reprogramación a iPSCs (Bhutani et al., 2010).

Lo que está claro es que derivar hESCs por aumentar el número de líneas existentes es ya obsoleto, aunque cabe destacar que el proceso de rechazo inmunológico está lejos de ser resuelto, y en teoría un panel extenso de hESCs podría solucionar en parte este problema. Se han establecido el número suficiente de hESCs para poder investigar. Esto no quita que se propongan nuevas estrategias en el método de derivación, cultivo de la colonia primaria sobre nuevos modelos celulares, el establecimiento de hESCs mutagénicas

para un amplio abanico de enfermedades, a partir de embriones afectados detectados por diagnóstico genético preimplantacional (DGP), etc. La única pregunta que nos quedaría por contestar es qué podemos hacer con los embriones congelados que sigue habiendo en las clínicas de reproducción, y que ya no son candidatos a ser utilizados para crear nuevas hESCs. Nuestra respuesta es clara, una cosa es investigar utilizando embriones, y otra cosa es estudiar el embrión, y hay todavía muchos aspectos por conocer acerca de la biología del embrión en sí.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alonso-Bedate C. Células troncales embrionarias (ES). Derivación, propiedades y capacidades funcionales. En: Investigación en células madre. Fundación Medicina y Humanidades Médicas. 2004, 23-41.

Bhutani N, Brady JJ, Damian M, Sacco A, Corbel SY, Blau HM. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature*. 2010;463: 1042-1047.

Cortés JL, Sanchez L, Ligeró G, Gutierrez-Aranda I, Catalina P, Elosua C, et al. Mesenchymal stem cells facilitate the derivation of human embryonic stem cells from cryopreserved poor-quality embryos. *Human Reproduction*. 2009;24: 1844-1851.

Cortés JL, Menéndez P. Reproductive medicine embryologists meet hESC research: need to adjust the regulatory framework to actual expectations about hESC research and its potential detrimental consequences. *Fertility & Sterility*, 2009;91:1417-1419.

Daley GQ, Lensch MW, Jaenisch R, Meissner A, Plath K, Yamanaka S. Broader implications of defining standards for the pluripotency of iPSCs. *Cell Stem Cell*. 2009;4: 200-201.

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981; 292: 154-156.

European Union 2004. Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 on setting standards of quality and safety for the donation, procurement, testing, processing, preservation, storage, and distribution of human tissues and cells. *Official Journal of the European Union*. 2004; L 102/48.

European Directive 2006/17/CE, February 8th, implementing Directive 2004/23/EC of the European Parliament and of the Council

as regards certain technical requirements for the donation, procurement and testing of human tissues and cells. 2006; L 38/40.

Guenther MG, Frampton GM, 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.

Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*. 2010; 143: 508-525.

Hu BY, Weick JP, Yu J, Ma LX, Zhang XQ, Thomson JA, et al. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; 107: 4335-4340.

Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, Närvä E, et al. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 2011;471: 58-62.

Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, et al. A small-molecule inhibitor of TGF- β signaling replaces Sox2 in reprogramming by inducing Nanog. *Cell Stem Cell*. 2009;5: 491-503.

International Stem Cell Initiative, Adewumi O, Aflatoonian B, Ahrlund-Richter L, Amit M, Andrews PW, Beighton G, et al. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol*. 2007; 25: 803-816.

Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010; 467: 285-290.

Ley 14/2006, del 26 de mayo, sobre Técnicas de Reproducción Humana Asistida. BOE núm 126. pg. 19947-19956.

Ley 14/2007, del 3 de Julio, de investigación biomédica. BOE núm 159. pg. 28826-28848.

Liew CG, Moore H, Ruban L, Shah N, Cosgrove K, Dunne M, et al. Human embryonic stem cells: possibilities for human cell transplantation. *Ann Med*. 2005; 37: 521-532.

Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, et al. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2011; 471: 68-73.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium

conditioned by teratocarcinoma stem cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1981; 78: 7634-7638.

Menendez P, Bueno C, Wang L, Bhatia M. Human embryonic stem cells: Potential tool for achieving immunotolerance?. Stem Cell Rev. 2005; 1: 151-158.

Menendez P, Bueno C, Wang L. Human embryonic stem cells: A journey beyond cell replacement therapies. Cytotherapy. 2006; 8: 530-541.

Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. Nature. 2008; 454: 49-55.

Mortimer D. A critical assessment of the impact of the European Union Tissues and Cells Directive (2004) on laboratory practices in assisted conception. RBM online. 2005; 11: 162-176.

Real Decreto 1301/2006, de 10 de noviembre, por el que se establecen las normas de calidad y seguridad para la donación, la obtención, la evaluación, el procesamiento, la preservación, el almacenamiento y la distribución de células

y tejidos humanos y se aprueban las normas de coordinación y funcionamiento para su uso en humanos. BOE núm 270. pg. 39475-39502.

Mosher JT, Pemberton TJ, Harter K, Wang C, Buzbas EO, Dvorak P, et al. Lack of population diversity in commonly used human embryonic stem-cell lines. N Engl J Med. 2010; 362: 183-185.

National Institute of Health. Stem cells (<http://stemcells.nih.gov/info/health.asp>)

Odorico JS, Kaufman DS, Thomson JA. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. Stem Cells. 2001; 19: 193-204.

Schuldiner M, Itskovitz-Eldor J, Benvenisty N. Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a "suicide" gene. Stem Cells. 2003; 21: 257-265.

Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, et al. Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. Nature. 2010; 465: 175-181.
Takahashi K, Yamanaka S. Induction of

pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006; 126: 663-676.

Solter D, Knowles BB. Immunosurgery of mouse blastocysts. Proc Natl Acad Sci USA. 1975; 72: 5099-5102.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science. 1998; 282: 1145-1147.

Wobus AM, Guan K, Pich U. In vitro differentiation of embryonic stem cells and analysis of cellular phenotypes. Methods Mol Biol. 2001; 158: 263-286.

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.

Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, et al. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. Science. 2009; 324: 797-801.



REPROGENETICS

COMPROMETIDOS
CON LA
INNOVACIÓN
EN DGP

DIRECTORES CIENTÍFICOS

Mireia Sandalinas - Carles Giménez

ANÁLISIS DE TODOS LOS CROMOSOMAS MEDIANTE ARRAY CGH (aCGH24)

REPROGENETICS SPAIN
pgdteam@reprogenetics.es
+34 93 241 77 24