



LAS IPS PARADIGMA ÉTICO DE LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

IPS AN ETHICAL PARADIGM FOR BIOMEDICAL RESEARCH

JOSÉ ANTONIO GÁMEZ ESCALONA

Universidad Monteávila
1060a Caracas
jgamez@uma.edu.ve

RESUMEN:

Palabras clave:

células trocales de Pluripotencialidad Inducida, factores de transcripción, células troncales embrionarias, medicina regenerativa, biología molecular y celular, transferencia nuclear

Recibido: 20/06/2013

Aceptado: 16/10/2013

El descubrimiento por parte de Shinya Yamanka y su equipo, en el año 2006, de las Células de Pluripotencialidad Inducida (iPS) en ratón, supuso uno de los grandes adelantos en la Biología Molecular y Celular. La posibilidad de que estas células se puedan generar también en seres humanos abre unas vías de desarrollo totalmente insospechadas para la Biomedicina. Su principal aporte es la creación de un protocolo robusto, que tiene en cuenta tres principales avances de la Biología como lo son las técnicas de transferencia nuclear, el descubrimiento de los factores de la transcripción asociados a la pluripotencialidad y el aislamiento de las Células Troncales Embrionarias de ratón. Un protocolo que puede ser replicado de manera sencilla en otros laboratorios para contar con la posibilidad de diseñar ensayos que permitan realizar modelos celulares para el estudio de enfermedades incurables; así como probar fármacos con células humanas o explorar las posibilidades de trasplantes autólogos de células, tejidos u órganos. La motivación ética de Yamanka fue buscar una alternativa al empleo de Células Troncales Embrionarias (ES), evitando la destrucción de embriones producidos por las técnicas de fecundación *in vitro* (FIV), así como el empleo de óvulos humanos. Además, ha resultado ser un modelo de investigación, en el que la intuición de los principios éticos y su aplicación en un proyecto biotecnológico de avanzada, ha supuesto la apertura de una nueva forma de entender la biología del desarrollo embrionario y la aplicación técnica de estos conocimientos. Puso así de manifiesto que el desarrollo, biológicamente entendido, no es una calle de un solo sentido. Las posibilidades de profundizar en los fundamentos de la Biología Molecular y la genética, junto con las expectativas de sus aplicaciones clínicas han hecho merecedor a Yamanka del Premio Nobel de Medicina 2012, junto a otro gran investigador Sir John Gurdon descubridor de las técnicas de transferencia nuclear.

ABSTRACT:

Keywords:

Induced pluripotent stem cells, transcription factors, embryonic stem cells, regenerative medicine, molecular and cell biology, nuclear transfer.

One of the greatest advances in molecular and cell biology was the discovery of the Induced Pluripotent Stem cells (iPS) in mice, by Shinya Yamanka and his team in 2006. The possibility that these cells can be generated also in humans opens up unexpected ways of development for biomedicine. Its main contribution is the creation of a strong protocol that takes into account three major advances in biology such as; nuclear transfer techniques, the discovery of transcription factors associated with pluripotency and the isolation of mouse embryonic stem cells. A protocol that can be easily replicated in other laboratories to have the opportunity to design tests that allow modeling of many incurable diseases, drug testing for human cells or explore the possibilities of autologous transplants of tissues or organs. Yamanka ethical motivation to find an alternative to embryonic stem cells (ES) and prevent the destruction of embryos produced by In Vitro Fertilization techniques (IVF), has proved to be a research model, in which the intuition of the

ethical principles and its application in advanced biotechnology projects, has meant the opening of a whole new way of understanding the biology of embryonic development. It is clear that development, biologically understood (puede ser también "treated"; tratado), is not a one-way street. The possibilities to deepen into the foundations of molecular biology and genetics, along with the expectations of its clinical applications have earned Yamanaka the Nobel Prize in Medicine 2012, along with another great scholar Sir John Gurdon, discoverer of nuclear transfer techniques.

1. Introducción

Una de las aportaciones más importante de los premios Nobel de Medicina y Fisiología del año 2012, fue el descubrimiento de que el proceso de desarrollo biológico no es estrictamente "one way street". El continuo debate que ha rodeado a este descubrimiento nos permite una reflexión acerca de la lógica, y por tanto de la ética, en las investigaciones biomédicas. No es banal, volver a recordar que la Medicina trata principalmente de la salud del hombre¹. Máxime cuando son temas de actualidad, con futuro prometedor en la biomedicina e iniciados con una fuerte carga ideológica y economicista.

Ante la concesión de este premio Nobel en 2012, las reacciones de la comunidad científica y de los medios de comunicación no han sido de indiferencia. Junto a un reconocimiento unánime del valor de los estudios pioneros acerca de los mecanismos y regulación del carácter pluripotencial, que define uno de los estadios de las células durante el desarrollo, muchos han destacado el enfoque ético de la investigación liderada por Yamanaka, mientras que unos pocos han tratado de minimizar su valor.

En un artículo de Yamanaka, que se citará en repetidas ocasiones (Yamanaka, 2012), el resumen inicial termina afirmando que el debate acerca del parecido o no entre las células inducidas al estado pluripotencial y las pluripotenciales sacadas de embriones, asunto en litigio desde que publicara su primer trabajo, es una cuestión a responder desde la ciencia y no desde la política o la economía.

2. En busca de la pluripotencialidad

Como en una nueva fiebre del oro, los investigadores en Medicina Regenerativa se han volcado en buscar los mecanismos que rigen la pluripotencialidad de

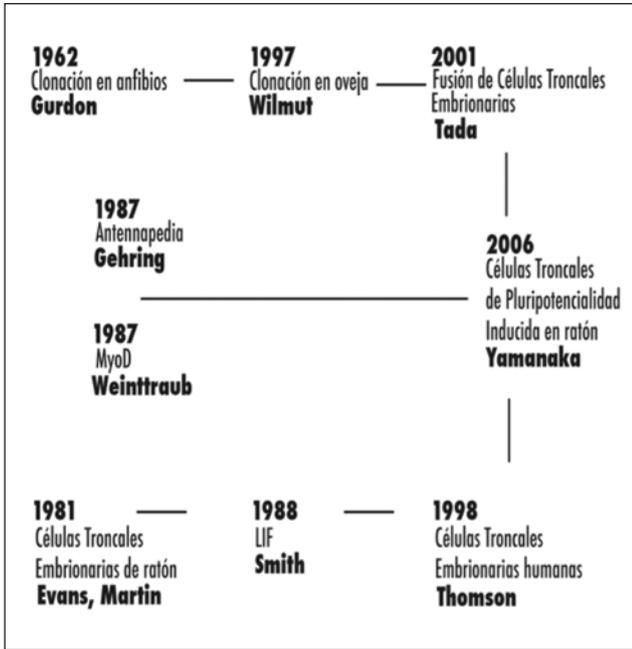
las células. Varios autores coinciden en señalar que el aislamiento y la derivación de las células troncales de origen embrionario (Thomson, Skovitz-Eldor, & Shapiro, 1998) fue un hito que estimuló los estudios sobre la pluripotencialidad (Silva & Smith, 2008). Todas las supuestas "utilidades" que se les adjudicaron a estas células hicieron que los científicos buscaran comprender mejor este fenómeno (Smith A., 2005). Las células troncales embrionarias aumentaron el interés por el fenómeno la pluripotencialidad, pero posiblemente el descubrimiento que más ayudó a aclarar los mecanismos que median a la misma, ha sido la posibilidad cierta de obtener células con pluripotencialidad inducida (iPS) (Fuchs, 2012).

Siempre, pero especialmente al comienzo de un nuevo abordaje que busca la comprensión de un proceso biológico, se necesita conocer los avances previos. Estos avances pueden iluminar racionalmente el planteamiento de las hipótesis, la metodología y las fuentes de donde se parte para los experimentos.

La Ciencia avanza helicoidalmente, nunca parte de cero, ni tampoco las ideas surgen lejos de los paradigmas que comparten la comunidad científica de la época.

Como explica el propio Shinya Yamanaka (Yamanaka, 2012), el desarrollo de las iPS es fruto de al menos tres corrientes de investigación biotecnológica, como muestra el esquema siguiente. Estas son: la reprogramación celular por transferencia nuclear, iniciada por John Gurdon en 1962 (Gurdon, 1962); la segunda es el descubrimiento de los factores de transcripción a partir de los experimentos de Schneuwly y sus colaboradores desde 1987 (Schneuwly, Klemenz, & Gehring, 1987), y la tercera los trabajos de aislamiento y cultivo de células troncales, de origen embrionario, que comenzaron con la primera generación de las de ratón en 1981 (Evans & Kaufman, 1981), y se concretaron en 1998 con la obtención de las células provenientes de blastocitos humanos (Thomson, Skovitz-Eldor, & Shapiro, 1998).

1 <http://www.nobelprize.org/mediaplayer/index.php?id=1827>



El esquema del mismo Yamanaka, muestra cómo han confluido las tres líneas de investigación en el planteamiento de la hipótesis de trabajo que dio como resultado, en el año 2006, la generación de iPS de ratón, abriendo un nuevo camino en la biomedicina.

En efecto, al unir las dos primeras fuentes de conocimiento, Yamanaka y su equipo plantearon la hipótesis de la existencia de una combinación de factores en los óvulos y/o en las células embrionarias capaces de reprogramar “hacia atrás”, rejuveneciendo las células que se habrían diferenciado y madurado. Esto es, son capaces de desdiferenciar una célula diferenciada hacia el estado de pluripotencialidad, en que no están totalmente determinadas o comprometidas, hacia una línea celular concreta.

A partir de esta hipótesis procedieron a diseñar protocolos experimentales que permitieran conocer cuáles son los factores que de forma selectiva ejercen la función de regular la diferenciación (Yamanaka, 2012), lógicamente apoyados en los conocimientos previos.

En tercer lugar, tienen en cuenta los descubrimientos acerca de las células aisladas de embriones tempranos de ratón, y de embriones humanos en estado de blastocito. Surgen con ello las principales cuestiones éticas de este planteamiento, que tiene la mirada puesta en sus fines más coherentes: conocer para curar, conocer para

expandir la biotecnología, que a su vez retroalimente el conocimiento.

3. Conocimientos previos de procesos reversibles y procesos irreversibles en el desarrollo orgánico

El desarrollo de las iPS implica el avance en una serie de conocimientos en la biología molecular, la genética y la biología del desarrollo. Estos avances se pueden resumir en:

1. El conocimiento de los procesos que median la plasticidad celular (Blau H. M., 1992) (Gehring W., 1967) (Gehring W. J., 1996) (Hardon, 1966) (Le Lievre & Le Douarin, 1975) (Yamanata & Blau, 2010)
2. La reprogramación celular por transferencia nuclear (Briggs & King, 1952) (Gurdon, 1962) (Wilmut, Schnieke, McWhir, Kind, & Campbell, 1997) (Rust, Ritchie, McWhir, & Wilmunt, 1993) (Eggan, et al., 2004) (Hochedlinger & Jaenisch, Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells, 2002) (Sinmonsson & Gurdon, 2004) (Yang, Smith, Tian, Lewin, Renard, & Wakayama, 2007) (Van Thuan, Kishigami, & Wakayama, 2010) (Stadtfeld & Hochedlinger, 2010)
3. Los factores de reprogramación que se evidencian por la fusión celular (Davidson, Ephrussi, & Yamamoto, 1966) (Chiu & Blau, 1984) (Blau, Chiu, & Webster, 1983) (Blau H. M., 1992)
4. El conocimiento de los factores de transcripción y su función reguladora (Stadtfeld & Hochedlinger, 2010) (Gehring W., 1967) (Schneuwly, Klemenz, & Gehring, 1987) (Gehring W. J., 1996) (Evans M., 2011) (Evans & Kaufman, 1981) (Evans M. J., 1972) (Kaufman, Robertson, Handyside, & Evans, 1983)

4. Primer criterio de una investigación éticamente correcta: Conocimiento pleno de los antecedentes científicos

De suyo, el respeto que merecen los animales y la dignidad inherente a cada ser humano marcan unos límites bien precisos, tanto a la experimentación con

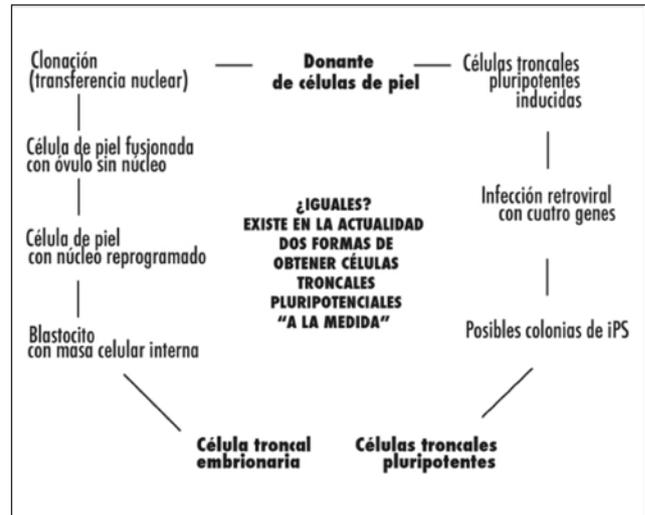
animales como en los ensayos clínicos. Estos límites están bien recogidos en los códigos correspondientes, y tienen una larga y fructífera experiencia de su aplicación. Yamanaka parte de una resolución: no usar ni embriones, ni óvulos humanos, como materiales de experimentación (Yamanaka, 2009). Los embriones son seres humanos y los óvulos, un peculiar tipo celular que transporta la herencia genética cuya obtención requiere manipulación de la endocrinología femenina.

El punto de partida marca con frecuencia la racionalidad del camino. Si se trata, como es el caso, de lograr células humanas en estado pluripotencial –tanto para estudiar esta capacidad, como si se trata de su posible uso con fines terapéuticos- se puede partir de las procedentes de embriones y añadir los factores necesarios para que avancen en esa dirección, o por el contrario, partir de células ya diferenciadas en el organismo e intentar la “marcha atrás”.

La importancia de no olvidar que los procesos fisiológicos ocurren en la unidad de un organismo, hace más válido de entrada el segundo camino: se trata de ver como se pierde *in vitro* algo que de forma natural se ha adquirido con el desarrollo vital. Tratar de que unas células adquieran *in vitro* funciones o propiedades para cuyo desarrollo se necesita el nicho natural en que están situadas en el organismo completo, parece un sistema deficiente.

El esquema muestra las dos vías de conseguir células en estado puripotencial, con dotación genética definida de un paciente, para uso de investigación clínica y/o terapéutica.

Si a la elección del camino, definido necesariamente por el material de partida, se une el “cómo” conseguirlo la diferencia de racionalidad de ambos sistemas se hace más evidente aún. Tanto si se trata de tener células pluripotenciales humanas como modelo celular de estudio de una enfermedad para prueba de fármacos, para obtener gametos, o en un último escalón para transferirlas a un enfermo y sustituir a las afectadas. En cualquier caso partir de la obtención de un embrión clónico del paciente en vez de tomar una muestra de sus propias células es evidentemente dispar. Tan dispar como un embrión y



una biopsia. En un artículo que analiza la posibilidad de células pluripotenciales obtenidas por técnicas de transferencia nuclear, se concluye que con independencia de las dudas y críticas que todavía existen respecto al protocolo utilizado por el equipo de Mitalipov (Tachibana, et al., 2013), todo parece indicar que los avances que se puedan lograr mediante estas técnicas ayudarán a descubrir nuevos factores de transcripción que permitan obtener nuevas iPS de mayor calidad (Sancho-Martinez & Izpisua Belmonte, 2013).

La lógica de la investigación científica y la experiencia acumulada a lo largo de generaciones de brillantes investigadores, nos aportan siempre las vías escoger la alternativa no destructiva, la que menos invada al organismo, la más parecida a la vía natural. Y siempre agotando las posibilidades que ofrecen las pruebas en animales, tanto para los ensayos de nuevas terapias, como para conocer el funcionamiento natural. La lógica de la investigación científica devuelve una y otra vez la pelota al tejado de la ética.

5. Segundo criterio: La elección de los materiales de partida para los experimentos en biomedicina no es indiferente

Las expectativas creadas en la sociedad y colectivos de enfermos acerca del potencial terapéutico de las células procedentes de embriones, las promesas de los recursos económicos que se derivarían de su utilización

biotecnológica, y especialmente la batalla para que la evaluación de dichas células no fuera por motivos científicos sino religiosos, basándose en que es un mero "prejuicio moral", fueron desproporcionadas. La destrucción de embriones humanos para obtener células pluripotenciales, marca un largo capítulo de menosprecio de las iPS por el hecho de no ser iguales que las procedentes de embriones. (Takahashi & Yamanaka, 2006)

Precisamente lo que busca Yamanaka, es poder lograr para las células adultas el nivel de pluripotencialidad. Es decir, las células troncales adultas cuya función natural es regenerar lo alterado, deben ser la base fundamental de las terapias. Sin embargo son generalmente escasas y crecen poco (Yamanaka, 2009). Se trata por tanto de rejuvenecerlas, no de llevarlas al estado embrionario. El proceso de desarrollo de las iPS establecerá los criterios oportunos y los llevará a cabo con los controles adecuados sin ceder al uso de las embrionarias humanas como referentes. En efecto, para entonces trataban de imponer las embrionarias como control universal de pluripotencialidad y como controles de la velocidad de crecimiento de células *in vitro*. Siguiendo una serie de trabajos logró el abordaje técnico para lograr iPS, para ello requirió la selección de los factores que podrían inducir pluripotencialidad en las células somáticas (Takahashi & Yamanaka, 2006). Para el momento en que Yamanaka comienza su estudio se conocían unos 24 factores de la pluripotencialidad. (Takahashi, et al., 2007) (Takahashi K., 2012) (Takahashi K., 2010) (Takahashi, Mitsui, & Yamanaka, 2003)

Posteriormente se tendrían que describir los procesos de transcripción de los genes de la pluripotencialidad, y diseñar un procesamiento que permitiera seleccionar los factores que son indispensables para lograr la pluripotencialidad. (Zhang, Yamanaka, Kim, Miura, & Iwao, 1999) (Maruyama, Ishisaka, Nakagawa, & Yamanaka, 2005) (Nichols, et al., 1998) (Avilion, Nicolis, Pevny, Perez, Vivian, & Lovell-Badge, 2003) (Niwa, Burdon, Chambers, & Smith, 1998) (Niwa, Miyazaki, & Smith, 2000) (Niwa, et al., 2005) (Chambers, et al., 2003) (Boyer, et al., 2005) (Mitsui, et al., 2003) (Burdon, Stracey, Chambers, Nichols, & Smith, 1999) (Cheng A., et al., 1998)

Ciertamente, el trabajo de aislar y caracterizar las iPS de fibroblastos de ratón no asegura conocer los mecanismos para derivar iPS a partir de células somáticas humanas. No obstante, una vez que se han definido los cuatro factores inductores (Oct 4, Klf4, Sox2, c-Myc) de la pluripotencialidad, la posibilidad de probarlos en células humanas era cuestión de tiempo. De hecho, en poco más de un año varios grupos de investigadores redefinen la metodología en ratones y extienden la reprogramación a las células humanas (Daley G., 2010).

Por otra parte, el auge de las investigaciones con las células pluripotenciales dirigido hacia su uso terapéutico es muy intenso en esos años. Queda abierta la posibilidad de que en un futuro cercano se puedan producir iPS a partir de células somáticas del propio paciente, todo un nuevo campo de desarrollo para la medicina regenerativa. Poder disponer de modelos celulares humanos de enfermedad es una prioridad.

6. Tercer criterio: el valor esencial de la experimentación previa en animales

6.1. La inducción de pluripotencialidad en células somáticas humanas

El trabajo publicado el 30 de noviembre de 2007 por el equipo de Yamanaka sería definitivo para dar a conocer a las iPS dentro de la comunidad científica (Takahashi, et al., 2007). Semanas después, James Thomson (Yu, et al., 2007) pionero en aislar células embrionarias humanas, auspicia un trabajo publicado en la revista Science en el que se obtienen iPS humanas por un procedimiento similar.

La diferencia del planteamiento para lograr un mismo objetivo, en ambos equipos queda de manifiesto en algunas afirmaciones y silencios. El equipo de Yamanaka deja claro las dificultades éticas que existen en el uso de los embriones humanos para obtener células troncales embrionarias. Por el contrario, el trabajo del equipo de Yu se refiere a las controversias que algunos han manifestado sobre el uso de las células embrionarias, pero no lo manifiesta como una dificultad objetiva. El trabajo de Thomson tampoco hace referencia a ninguna de las dificultades técnicas mostradas por las células troncales

embrionarias. Los autores de este trabajo manifiestan conflictos de intereses financieros, por el compromiso con varias de las empresas que dirige Thomson; en varias oportunidades hace mención y recomienda células y otros materiales patentados por estas empresas de biotecnológicas (Yu, et al., 2007). La descripción de la metodología presentada en este trabajo es mucho menos explícita y detallada que la que presenta Yamanaka, como ocurre cuando una publicación se adelanta a la patente. El análisis para la selección de los factores de inducción carece del rigor que muestra el trabajo de Takahashi y Yamanaka (Takahashi & Yamanaka, 2006).

La poca claridad sobre las dificultades técnicas que se vienen dando a conocer sobre las células embrionarias hacen que, al pasar pocos años, la situación se haga excesivamente compleja. Una multitud de laboratorios han ido consiguiendo iPS desde diversas fuentes y con diferentes protocolos. Caracterizar todos esos clones de iPS y comparar cada uno con las embrionarias es tarea difícil, costosa, y sobre todo inútil.

Es preciso antes, unificar métodos y comparar resultados. Son aspectos decisivos para avanzar con rigor, lo que evita crear falsas expectativas, rivalidad entre los investigadores y permite sumar fuerzas ante unos descubrimientos que se vislumbran prometedores para la medicina.

6.2. Evaluación de la pluripotencialidad y diferenciación de las iPS: la competencia con las ES

Las circunstancias exigen comenzar a trabajar con las ES. Son momentos de grandes presiones en la comunidad científica. Las declaraciones acerca del interés de esta acción por parte del recién elegido presidente de los EEUU, Barack Obama (más allá de las implicaciones políticas que puedan tener) ponen de manifiesto dos cuestiones. En primer lugar la existencia de científicos involucrados en las empresas de biotecnología, y en íntimo consorcio con los centros de reproducción asistida que siguen potenciando la vía de crear embriones humanos *ad hoc* para usarlos como material terapéutico y de investigación. Por su parte, los científicos que trabajan con células embrionarias recomiendan estrategias comparativas entre las iPS —como en su día ocurrió con

las células troncales de adulto— con las procedentes de embriones, consideradas el *estándar de oro*. Las ES se han estudiado a lo largo de más de 10 años, y el origen común de todas ellas en los embriones en estado de blastocito hace que de hecho sean menos diversas que las iPS derivadas desde diferentes tejidos de adulto y con diferentes métodos.

En segundo lugar, la existencia de un sentir más común de que —con independencia de que los fondos federales, o comunitarios en el caso de la Unión Europea puedan usarse legalmente para derivar nuevas líneas desde embriones humanos— éticamente se podrían crear nuevas líneas de modo «temporal y limitado», en cuanto sean necesarias para validar las pluripotenciales reprogramadas desde células somáticas —sin destrucción de embriones ni uso de óvulos—, y en la medida en no sean suficientes para ello las que ya existen. En Europa también se ofrece apoyo gubernamental a estos proyectos de investigación. (Ben-David, Kopper, & Benvenisty, 2012)

¿Es legítimo usar las células que otros han obtenido a partir de embriones humanos como controles de la investigación? Algunos piensan que está justificada esta cooperación por el beneficio médico que se derivará de esta investigación. Tiene como dirimente el convencimiento de muchos en que es la última batalla a ganar para que la terapia regenerativa se base exclusivamente en las células de adulto, acabando con la destrucción de embriones y la utilización de óvulos para conseguir este tipo de material biológico (Baker, 2009).

Evidentemente es importante evaluar la pluripotencialidad. Es preciso establecer una «línea base» desde la que se puedan medir los avances en las iPS, puesto que su pluripotencialidad es artificial y mimetiza la también artificial de las embrionarias una vez sacadas de su nicho dentro del embrión.

Ahora bien, la lógica científica exige por una parte un trabajo previo, y por otra unos criterios de similitud que serán positivos o negativos para la comparación, ya que las embrionarias han demostrado demasiados fallos como candidatas para el desarrollo de terapias.

Yamanaka plantea en abril de 2009, que a corto plazo hay que iniciar el análisis comparativo entre las iPS

obtenidas por diversos métodos y en diversos laboratorios. De esta forma se podría establecer cuáles son las líneas que aseguran la diferenciación total, y poder avanzar en su uso en Medicina Regenerativa. Se trata de purificarlas correctamente y en definitiva desarrollar métodos sencillos y sensibles para evaluar la efectividad y seguridad de los miles de clones y subclones de iPS generados por las diferentes técnicas que se vienen utilizando (Yamanaka, 2009). El avance en esta investigación no está condicionado a su comparación con las embrionarias.

No hay que renunciar a la exigencia de la ética de la investigación, en cuanto cooperación a que se sigan destruyendo embriones. La comunidad científica, y los científicos en particular, tienen que potenciar, cueste lo que cueste, la creatividad para buscar las alternativas y la necesidad de validar la capacidad de las iPS de diferenciarse al nivel deseado.

Yamanaka usó ES ya existentes en el último control de las iPS diferenciadas a troncales adiposas; habían realizado toda la experimentación rigurosa en animales; se carecía de otra posibilidad y había que evitar que se hicieran pruebas en múltiples laboratorios, sin los experimentos previos en animales y se generase la «necesidad» de crear nuevas líneas desde embriones (Taura, et al., 2009). Unas semanas después lleva a cabo la generación de células de la retina desde iPS, basándose en el conocimiento de la diferenciación de las ES de ratones, sin usar ES como control (Hirami, et al., 2009) y continua estableciendo controles en ratón y comparando con ES. De esta forma, marca los límites correctos de evaluación del potencial diferenciador.

Yamanaka seguirá tratando de sacar los máximos conocimientos usando ratones. Una gran cantidad de conocimientos, extrapolables en su mayoría a las células humanas, son factibles en experimentos con ratones comparando las embrionarias y las iPS. Lo que se conozca de los marcadores de la diferenciación en el desarrollo embrionario y de los mecanismos, guiarán la tarea de comprobar cómo son las iPS humanas y su posterior diferenciación, sin que la comparación requiera uso directo y obtención de células pluripotenciales de embriones

humanos. La creatividad científica de Yamanaka hace posible que con su equipo pueda publicar en 2009 una proeza con una original estrategia (Aiba, et al., 2009)

Esto nos aporta o ratifica un criterio de validez general; el uso legítimo de material humano, ES, ilegítimamente obtenido por otros, sólo como controles comparativos de la investigación debe cumplir al menos las siguientes condiciones: a) agotar la comparación previa entre iPS y ES diferenciadas de ratón lo que será suficiente, en muchos casos, para extrapolar dicha comparación a células humanas; b) en los casos en que no haya garantía de la validez de la extrapolación se trataría de usar exclusivamente las líneas celulares existentes con anterioridad. Se trata así de no crear nuevas líneas durante un periodo “puente” de evaluación de las iPS, y establecer condiciones que limiten la producción e impidan un renacer del negocio biotecnológico consumidor de embriones, con motivo de este uso.

La opinión favorable a la ética de la investigación llevada a cabo por este gran científico pionero de las iPS, no significa restar importancia al uso por cualquier investigador de células ES como controles de su investigación. Yamanaka ha conducido magistralmente la investigación mundial en este campo sacándola de hecho de la producción y consumo de embriones. La cooperación mínima a un mal realizado por otros no tiene en este caso ni peligro de escándalo. Por su valentía y claridad para denunciar el consumo de embriones y dar soluciones reales a la línea, en la dirección del respeto a la vida humana embrionaria; tampoco supone promocionar dicho consumo.

Existen tres manifestaciones básicas de la pluripotencialidad de las células embrionarias: la formación de teratomas, la formación de quimeras, y en cuanto a su posterior diferenciación, la formación de cuerpos embrioides.

1. Un asunto controvertido en parte aún pendiente en la derivación de las iPS, se refiere a cuál es el estándar mediante el cual es evaluada su pluripotencialidad (Selvaraj, Plane, Williams, & Deng, 2010) (Wernig, Meissner, Cassidy, & Jaenisch, 2008) (Maherali & Hochedlinger, 2008), para aplicarlas a la terapia. Es el asunto más importante para estudiar los mecanismos de funcio-

namiento de la reprogramación. Se necesita un método barato, reproducible y rápido que sirva para establecer la calidad de las líneas de iPS recién derivadas (O'Malley, Woltjen, & Kaji, 2009) (Wang & Blelloch, 2009). Quizá podría identificarse un patrón de expresión genética y epigenética que defina la reprogramación total de las iPS y las ES (Tobin & Kim, 2012). Con ello se dispondría de un gran producto de prueba para las líneas celulares (Kiskinis & Eggan, 2010). La influencia ambiental o microambiental —el entorno próximo a cada célula— es un aspecto que se viene trabajando con el fin de mejorar las posibilidades terapéuticas de las células troncales. Parece que hay una relación muy estrecha entre las características de estos nichos y el destino de diferenciación celular (Peerani & Zandstra, 2010).

Según el propio Yamanaka, determinar si existen diferencias entre los dos tipos de células pluripotenciales, y en el caso de que las haya, si estas diferencias son funcionalmente relevantes, es una cuestión fundamental. Al inicio de los estudios con las iPS, estaban fascinados por su notable similitud con las embrionarias. Sin embargo a partir de 2009, los científicos comenzaron a informar diferencias entre ambas. Unos describieron diferencias en expresión génica (Chin, et al., 2009). De gran interés fue el dato de que en las iPS persisten marcadores de la células somáticas a la que se induce pluripotencialidad (Ghosh, Wilson, Wu, Hu, Quertermous, & Wu, 2010); (Marchetto, Yeo, Kainohana, Marsala, Gage, & Muotri, 2009). Se encontraron diferencias en la metilación del ADN y las características epigenéticas según la célula inicial (Doi, et al., 2009) (Deng, et al., 2009). (Ohi, et al., 2011) (Lister, et al., 2011) (Kim, et al., 2011).

Por otra parte, también mostraron como muchos de los clones derivados de las embrionarias o de las iPS se superponen en la expresión génica (Guenther, et al., 2010) (Newman & Cooper, 2010) (Bock, et al., 2011).

2. El otro aspecto importante de discusión ha sido la capacidad de la células para diferenciarse, y si las iPS son funcionalmente diferentes de las ES a este respecto. La agrupación espontánea de las células pluripotenciales como cuerpos embrioides permite una diferenciación regional, en la que se pueden distinguir mediante

marcadores moleculares, células pertenecientes a las tres capas germinales (Itskovitz-Eldor, et al., 2000). Las iPS forman cuerpos embrioides, que tras cultivo, muestran células de diferentes morfologías que corresponden a las derivadas de cada una de las tres capas germinales. Se probó así la capacidad de las iPS de diferenciarse en células de cada una de las capas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo (Takahashi, et al., 2007).

El equipo de Hu realizó *in vitro* la diferenciación neural dirigida de cinco clones humanos ES y 12 iPS (Hu, et al., 2010). La eficacia resultó ser mucho mayor para las ES. Sin embargo, otros trabajos examinaron 16 clones humanos iPS en cuanto a su capacidad de diferenciarse en neuronas motoras y encontraron que 13 de estos clones iPS se diferenciaron con eficacia comparable a los de ES (Boulting, et al., 2011). Los resultados no son contradictorios sino que, en conjunto, estos estudios mostraron que los clones iPS y ES se solapan en grados de variación de unos a otros, como ya se había descrito (Ward, Barrow, & Stern, 2004) (Osafune, et al., 2008).

7. Cuarto criterio: Liberación de presiones y prejuicios para obtener los criterios de constatación de las hipótesis

7.1. Desde el inicio aparecen dudas razonables de las posibles aplicaciones de las iPS a la medicina

1. Se encontró que las iPS no podían mantener su carácter indiferenciado cuando se cultivan en ausencia del lecho de células que liberan LIF (Factor Inhibidor de Leucemia según siglas en inglés). Las iPS resultaron positivas para la fosfatasa alcalina y se pueden diferenciar en las tres capas germinales *in vitro*, lo que confirma su carácter clónico. Todos estos hallazgos descartan la posibilidad de que las iPS puedan ser residuos de células troncales embrionarias remanentes.
2. Debido a que la eficiencia del proceso de inducción es muy baja, se planteaba la posibilidad de que el origen de las iPS fuera las células troncales que se encuentran en el tejido adulto (Takahashi & Yamanaka, 2006). Pero la eficiencia no dependía de la abundancia inicial de células troncales adultas multipotentes, y además sólo con tres factores no se conseguía in-

ducir pluripotencialidad. No parece por tanto que el origen de las iPS sea células troncales adultas, y no células diferenciadas. Realmente el protocolo ha inducido la pluripotencialidad, y obviamente quedan dudas por resolver que requieren tiempo.

3. Por otra parte, está el tema del por qué de la falta de eficiencia. Es posible que los factores de inducción sólo se expresan en estrechos márgenes, y los rangos específicos de concentración sólo podría ser alcanzado por algunas células (Niwa, Miyazaki, & Smith, 2000); de hecho, los niveles de proteínas sugieren que las iPS tienen unos mecanismos para controlar estrechamente estos niveles de expresión de los cuatro factores. Por otra parte, se sabe poco de cómo los cuatro factores seleccionados actúan sobre la reprogramación celular. Y qué papel desempeñarían en la programación de un núcleo de células diferenciada transferido a un óvulo desnucleado. Es posible que las modificaciones epigenéticas que ocurren con la diferenciación lleven a silenciar y eliminar el proceso de expresión retroviral.

Posteriormente, se desarrollan teorías para explicar la baja efectividad de la inducción de las iPS, con el deseo de comprender cuáles son los mecanismos que subyacen en el proceso (Stadtfield & Hochedlinger, 2010). Los problemas son claros: la eficiencia es entre 0.01%–0.1%, el proceso es muy lento, de aproximadamente 2 semanas, y la reprogramación parcial.

Estas teorías podrían resumirse en:

- El Modelo de Élite
- El Modelo Probabilístico
- Factores Estocásticos (Yamanaka, 2009)

7.2. Una vez rejuvenecidas a pluripotenciales se precisa diferenciarlas

Si las iPS son pluripotenciales han de ser capaces de diferenciación siguiendo las metodologías usadas para las ES. Una vez reprogramadas “hacia atrás” deberían poder diferenciarse a todos los tipos celulares de las tres capas germinales. Esto permitiría probar la capacidad que tienen para derivar directamente en los diferentes linajes celulares.

Ambos tipos de células pluripotenciales —las ES y las iPS— pueden convertirse en cualquier tipo de células maduras y son útiles para hacer la “disección” de los mecanismos de enfermedades, para probar fármacos y nuevas terapias.

7.3. Una competencia poco clara

Varios informes siguen exagerando los defectos de la iPS: además de la variación en la expresión génica, la metilación del ADN, y el potencial de pluripotencialidad, hay otras anomalías potenciales en iPS, incluyendo mutaciones somáticas (Gore, et al., 2011), variaciones del número de copia (Hussein, et al., 2011), y la inmunogenicidad (Zhao, Zhang, Rong, & Xu, 2011).

Además, se siguen apuntando “nuevos defectos” (Apostolou & Hochedlinger, 2011) (Dolgin, 2011) (Check Hayden, 2011) (Pera M., 2011) (Zwaka, 2010).

Sin embargo, pese a estos titulares, los análisis han indicado que muchas de las diferencias genéticas encontradas en las iPS parecen haber existido previamente en la célula somática original, y por lo tanto surgió de forma independiente del propio proceso de la reprogramación (Cheng, et al., 2012) (Young, et al., 2012). La reprogramación para formar iPS es clonal. De esta forma, las variaciones que existen en una frecuencia baja dentro de la población celular de partida pueden ser más evidentes cuando se analiza individualmente clones derivados de ella, y al compararlas con la célula parental de la población como un todo. Otro estudio mostró que un conjunto de clones iPS tienen muy pocas alteraciones genéticas en relación con sus células de partida (Quinlan, et al., 2011). Con respecto a la inmunogenicidad se observó en células indiferenciadas, que nunca serían usadas en la terapia de trasplante (Zhao, Zhang, Rong, & Xu, 2011).

A pesar de todos estos trabajos, ninguno puede asegurar que esas deficiencias de las iPS, estén superadas en las líneas celulares obtenidas a partir de las ES. En resumen, las ES no son un control final o “estándar de oro” para las iPS. El camino sugerido para estudios futuros, es que estos deberían centrarse en la capacidad de las iPS para formar nuevos tejidos, órganos y organismos modelo.

Es muy posible que no sean los mismos mecanismos que desarrollan a las ES *in vivo*, los que tienen lugar en la generación de las iPS. Existen factores que actúan en el inicio del proceso de reprogramación para llegar al estado de pluripotencialidad, y hay otros factores que actúan en el mantenimiento de ese estado (Yamanaka, 2009).

7.4. Las fronteras entre la ciencia y la tecnología

En biomedicina en general hay que hablar de investigación "pura" aplicada al cáncer, o a la terapia regenerativa, etc. Es bien conocido que la búsqueda del origen del cáncer, con fines obviamente terapéuticos, desde hace más de 50 años ha promovido la mayor parte, y desde luego los más importantes, conocimientos de la biología. De forma similar el posible uso de células inmaduras –pluripotenciales– ha hecho avanzar el conocimiento del desarrollo embrionario, la epigenética, etc.

No obstante, los mecanismos moleculares por los que las células son reprogramadas a un estado similar al embrionario son en gran parte desconocidos. Hay vías de metilación del ADN, acetilación y metilación de las histonas que influyen en la forma en que actúan cada uno de los factores, pero estos procesos todavía tienen que ser aclarados. Las mismas especulaciones de Yamanaka acerca de que los factores Klf4 y c-Myc pueden modificar la estructura de la cromatina, mientras que Oct4 y Sox2 son capaces de unirse a "genes diana", han hecho avanzar las condiciones del protocolo de inducción del estado de pluripotencialidad.

Lejos de quedarse en la limitación que significa ese desconocimiento, los investigadores que trabajan en esta línea de desarrollo se han dedicado a buscar formas de seguir profundizando en la biología de la reprogramación y de la pluripotencialidad. Esto además forma parte fundamental de una comprensión más completa del desarrollo embrionario y la genética. Las consecuencias de este trabajo serán eminentemente prácticas por la ayuda que pueden prestar a hacer más eficiente el proceso de reprogramación, y a cubrir de manera responsable las expectativas, que en clínica y terapéutica, se hacen respecto a las iPS. Como expresan algunos

autores: "La misión científica de las células troncales es revelar cómo la información genética es traducida dentro de la formación de los tejidos y la organogénesis" (Daley G., 2010). El descubrimiento de las iPS hace que ese servicio al conocimiento científico se muestre progresivamente más evidente.

Los datos sugieren que el circuito central de transcripción que regula la pluripotencialidad es similar en el ratón y en el humano (Boyer, et al., 2005), pero las condiciones y señales extrínsecas que mantienen la pluripotencialidad son diferentes para cada especie (Takahashi, et al., 2007). Posteriormente se ha descrito el papel negativo de c-Myc en la multiplicación de las células embrionarias humanas (Sumi, Tsuneyoshi, Nakatsuji, & Suemori, 2007), lo cual contrasta con el papel positivo que juega en el mismo proceso pero en células embrionarias de ratón (Cartwright, McLean, Sheppard, Rivett, Jones, & Dalton, 2005).

El deseo legítimo de usar la biotecnología no puede hacer olvidar el avance riguroso en el proceso que se investiga, ni necesariamente han de conocerse todos los mecanismos para comenzar su aplicación terapéutica.

7.5. Los modelos celulares: una primera aplicación de las iPS

Para la biomedicina ha sido de especial interés el hecho de que se haya logrado inducir pluripotencialidad a células somáticas procedentes de enfermos (Park, et al., 2008). Esta posibilidad aporta un material insustituible para conocer los mecanismos moleculares, diseñar y probar terapias y fármacos. Al menos cuatro laboratorios han conseguido generar células iPS desde células de pacientes. Estos incluyen una variedad de enfermedades con origen genético y enfermedades degenerativas (Park, et al., 2008).

En el campo del establecimiento de modelos celulares para el estudio de enfermedades genéticas, tanto mendelianas como de herencia compleja, se vienen desarrollando con éxito el cultivo y diferenciación de iPS. Partiendo de células (fibroblastos o células de la médula ósea) de pacientes con alguna de estas enfermedades genéticas se lograron colonias de iPS. Estas colonias

fueron posteriormente analizadas para confirmar que en el genotipo de las células derivadas se encontraban las mutaciones correspondientes a cada enfermedad. Los resultados confirmaron la hipótesis de que estas iPS contienen las mutaciones o defectos genéticos de las células de donde provienen. De esta forma, se establece un campo de experimentación biomédica de amplio espectro. Debido al potencial proliferativo de las iPS, la recombinación homóloga puede ser usada para corregir ciertos defectos genéticos previa a un trasplante. Como es lógico aparecen nuevos riesgos por mutaciones en esta tecnología. Un ejemplo es la atrofia girada (Howden, et al., 2011). También hay trabajos en la esclerosis lateral amiotrófica (Dimos, et al., 2008), la atrofia muscular medular (Ebert, et al., 2009) y otras enfermedades musculoesqueléticas (Tedesco, Dellavalle, Diaz-Manera, Messina, & Cossu, 2010).

Otro modelo celular descrito recientemente se refiere al síndrome CINCA, que es una enfermedad genética debida a una mutación en el gen NLRP3, que fenotípicamente se manifiesta como un mosaicismo por la dificultad de separar las células portadoras de la mutación de las que no lo son (Tanaka, et al., 2012). Adicionalmente, se han modelado enfermedades infecciosas como la Hepatitis C utilizando iPS infectadas con el virus (Si-Tayeb, Duclos-Vallée, & Petit, 2012). En algunas enfermedades hematológicas las iPS han mostrado no sólo servir para establecer modelos celulares de estudio de la enfermedad, sino que además han proporcionado una posibilidad de cura de enfermedades como la anemia de Falconi, mediante la generación de líneas celulares libres de enfermedad. De esta forma se muestra que las iPS pueden tener también un gran potencial terapéutico (Raya, et al., 2009). Es notable que las células hematopoyéticas han permitido conocer que el estadio de diferenciación celular desde el que se reprograma es determinante para el éxito de la derivación en iPS (Eminli, et al., 2009). No obstante quedan por superar algunas deficiencias para el desarrollo de los modelos de enfermedades, como son la diferenciación ineficiente y la purificación. Será preciso además examinar qué parte del desarrollo in vivo puede ser recapitulado en modelos celulares de enfermedad.

8. Quinto criterio: no hay frontera nítida entre la investigación teórica y sus aplicaciones.

8.1. Responsabilidad de las aplicaciones basadas en los descubrimientos

Precisamente por que la frontera entre investigación pura y aplicada es con frecuencia poco nítida, no es posible conformarse con que las aplicaciones las van a llevar a cabo "otros colegas". La tecnología derivada del conocimiento es siempre ambivalente: puede emplearse en más de una dirección.

No es muy frecuente que un investigador alerte y exija una moratoria para el uso de su descubrimiento. Yamanaka lo hace ante la tentación de usar las iPS humanas para la creación *in vitro* de células germinales y usarlas para procreación. De estas células se podrían derivar gametos, usables para tratamientos de infertilidad, o hacer quimeras humanas mediante la incorporación de iPS de un adulto a un blastocito obtenido *in vitro*. Desde el primer momento Yamanaka previno a las autoridades de su país, para que estas células no pudieran ser usadas con fines reproductivos. Él mismo asume la dirección ética del grupo regulador del gobierno de su país, Japón. El ministro de Ciencia japonés envió en el 2007 a todos las universidades y centros de investigación una notificación que específicamente prohíbe «la implantación de embriones producidos a partir de las iPS en úteros humanos o de animales, la producción de un individuo a partir de iPS, la introducción de células iPS en un embrión o un feto, y la producción de células germinales desde iPS» (Kawakami, Sipp, & Kato, 2010).

Posteriormente se revisa la prohibición y se establecen directrices adicionales en 2010. Se permite la investigación relacionada con la diferenciación de las células germinales, los mecanismos del desarrollo, la regeneración y los procedimientos de diagnóstico y prevención. Sin embargo, la fertilización a través de los gametos derivados de las células troncales pluripotentes sigue prohibido (Kawakami, Sipp, & Kato, 2010).

Esa acción dejaba claro desde el inicio de esta vía de investigación, que no es válida la improvisación ni puede haber experimentación sin un auténtico rigor científico.

Shinya Yamanaka ha expresado sobre el tema de la regulación legal basada en normas éticas:

“Scientific technologies are double-edged swords: they can provide many benefits for humanity, but at the same time can be harmful. Thus, regulations are necessary. I think that it is essential for scientists to exert their best efforts to explain the pros and cons of their developing technologies to the public using language that is easy to understand, but as accurate as possible. Therefore, this field of research needs talented science communicators who can explain both the merits and disadvantages of their research” (Blanpain, Daley, Hochlinger, Passequé, Rossant, & Yamanaka, 2012).

8.2. En busca de un modelo para el estudio de la esterilidad

Esta moratoria no supone falta de interés en solucionar el grave problema de la esterilidad. El linaje de células germinales en los mamíferos se origina a partir de epiblastos pluripotentes como células germinales primordiales, que se desarrollan de forma dismórfica generando espermatozoides o ovocitos. Se necesitaban modelos *in vitro* con células humanas para conocer el desarrollo normal y patológico de la línea germinal. Una estrategia es la utilización de células troncales pluripotenciales humanas.

Yamanaka busca un modelo celular para el estudio de la infertilidad o esterilidad causada por la alteración o la ausencia de células germinales (espermatozoides u óvulos), un importante problema médico que permanece incurable en gran medida. Para entender mejor los mecanismos moleculares precisos de la infertilidad y el desarrollo de fármacos para el tratamiento de esta condición, 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 paciente, que requerirá, como es lógico, futuros perfeccionamientos (Hayashi, Saitou, & Yamanaka, 2012).

Con los conocimientos que se vayan logrando acerca de los procesos de la gametogénesis, y las posibles alternativas de obtener células germinales humanas sumado

a los estudios precedentes de maduración de germinales de ratón, Yamanaka y su equipo están en disposición de lograr el modelo que permita el conocimiento preciso, a nivel molecular, de las patologías de la infertilidad. De esta forma, se podrá tener la posibilidad de desarrollar nuevos tratamientos. (Cooke & Saunders, 2002) (Ferlin, Raicu, Gatta, Zuccarello, Palka, & Foresta, 2007) (Shelling, 2010) (Persani, Rossetti, & Cacciatori, 2010) (Wong & Cheng, 2011) (Angenard, et al., 2010) (Angenard, et al., 2011) (Lambrot, et al., 2007) (Kee, Flores, Cedars, & Reijo Pera, 2010) (Coutts, Fulton, & Anderson, 2007) (Park, et al., 2008) (Park, et al., 2008) (Saha & Jaenisch, 2009) (Hoyer, 2005) (Imamura, et al., 2010) (Bucay, et al., 2009) (Park, et al., 2009) (Geens, Sermon, Van de Velde, & Tournaire, 2011) (West, Machacek, Boyd, Pandiyan, Robbins, & Stive, 2008) (Hua & Sidhu, 2008) (Hayashi, Chuva de Sousa Lopes, & Surani, 2007) (Richardson & Lehmann, 2010) (Sasaki & Matsui, 2008) (Boldajipour & Raz, 2007) (Hayashi, Ogushi, Kurimoto, Shimamoto, Ohta, & Saitou, 2012).

9. Sexto criterio: existe responsabilidad ante las posibles desviaciones de los conocimientos aportados por la propia investigación

9.1. Avances en biología molecular tras los estudios de la pluripotencialidad

La motivación principal de entregar el Premio Nobel de Medicina 2012 a John Gurdon y Shinya Yamanaka es: “por el descubrimiento que las células maduras pueden ser reprogramadas para convertirse en pluripotentes”. Se otorga por un avance en la biología celular y molecular que tendrá repercusiones médicas. Por esta razón, antes de explorar las consecuencias biomédicas que tienen las iPS, conviene señalar las nuevas vías que se abren para la biología (Yamanaka, 2009). El desarrollo de las iPS puede ser visto como un ensayo bioquímico de la pluripotencialidad. Las modificaciones cualitativas y cuantitativas sobre este ensayo experimental pueden ir revelando mecanismos bioquímicos y genéticos, que hasta ahora permanecen ocultos.

En primer lugar, facilitan una mayor comprensión de la epigenética. Se tiene experiencia que durante el proceso de reprogramación muchas células quedan atrapa-

das en un estado de reprogramación parcial. Este estado parece estar motivado por una deficiente desmetilación del ADN, y una represión/expresión ectópica incompleta de los factores de transcripción que comprometen con linajes celulares específicos (Mikkelsen, et al., 2008).

En segundo lugar, aunque se desconoce la función específica de cada uno de los factores de inducción, y que la vía de inducción de la iPS no tiene representación *in vivo*, se puede inducir que deben haber muchos procesos que tienen paralelismo con eventos fundamentales en el desarrollo embrionario de los mamíferos. La generación de las iPS en cuanto, "retroceder la película del desarrollo embrionario" aportará sin duda muchos datos que son aplicables a la comprensión de los fenómenos que ocurren *in vivo*.

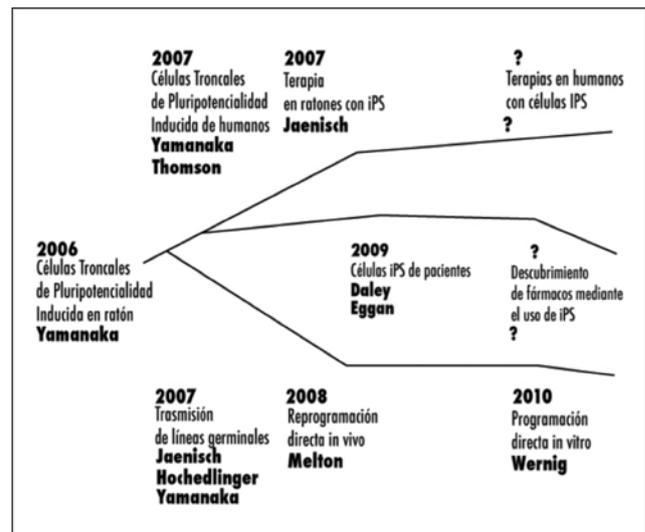
Otra de las áreas donde las iPS pueden aportar nuevos conocimientos, se refiere a los fundamentos moleculares de la generación de los tumores de células germinales (Blelloch, Venere, Yen, & Rhamalo-Santos, 2007), ya que los tumores de células germinales tienen un circuito de factores de transcripción similar al de las iPS, que incluye Oct4, Sox2, Nanog. Aunque no expresan ni el factor Klf4, ni tampoco el factor c-Myc, si dependen de la expresión de otros factores de esta misma familia (Sridharan, et al., 2009).

De igual forma, las iPS pueden aportar nuevos conocimiento en la biología de los micro-RNA. Se sabe que varios de los micro-RNAs están involucrados en la optimización del proceso de inducción de la pluripotencialidad, en las células troncales embrionarias (Judson, Babiarz, Venere, & Blelloch, 2009). Además se conoce que existen factores remodeladores de la cromatina, que en conjunto con los factores de transcripción y los micro-RNA actúan en la conservación de el estado embrionario similar (Gaspar-Maia, et al., 2009). De manera análoga, es muy posible que se puedan encontrar respuesta a muchos asuntos referentes al papel que tienen en la pluripotencialidad las proteínas de las vías de señalización de las rutas metabólicas, las del ciclo celular y las proteínas del citoesqueleto.

Mas allá de responder todas estas preguntas, la generación de las iPS hace asequible una aproximación sencilla para el estudio de las proteínas, o péptidos y sus

factores de transcripción en orden a disecar el proceso de la pluripotencialidad.

También es posible que los ensayos con las iPS nos permitan conocer más a fondo la estabilidad del estado de diferenciación celular. Se supone que el estado de diferenciación se puede perder cuando las células adultas pierden ciertas señales moleculares. Por lo tanto, hay "genes claves" que mantienen a las células "protegidas" de los elementos que pueden inducir su desdiferenciación (Wang & Blelloch, 2009) (Duinsbergen, Eriksson, 't Hoen, Frisé, & Mikkers, 2008). Tal sería el caso de futuros ensayos con las iPS para determinar los mecanismos por los que el gen P53 modula la estabilidad de la célula diferenciada (Mikkelsen, et al., 2008). Así como también, el papel en la desmetilación del ADN o las histonas, de otros tumor represores como Rb o Pten. Más ampliamente, la similitud que existe entre los procesos de transcripción de las células troncales pluripotenciales y el cáncer (Wong, Liu, Ridky, Cassarino, Segal, & Chang, 2008), hace suponer que se descubrirán nuevos genes que sean supresores de tumores (Wang & Armstrong, 2008) (Frank, Schatton, & Frank, 2010). El trabajo pionero de Yamanaka ha inspirado nuevos abordajes y se han creado nuevos paradigmas para la terapia regenerativa, como muestra el esquema siguiente.



Yamanaka divide las posibilidades de aplicación clínica de las iPS en: aplicaciones para la medicina regenerativa y aplicaciones *in vitro*. Hasta el momento se

han reconocido tres áreas de aplicación clínica de las iPS: terapias de sustitución celular, modelaje de enfermedades para el descubrimiento de drogas específicas, toxicología y farmacología predictiva (Yamanaka, 2012). Las iPS se han ido haciendo cada vez más accesibles para la investigación y muy posiblemente en corto tiempo para las aplicaciones clínicas. La tecnología de las iPS ya está lista para muchas aplicaciones, incluyendo las terapéuticas. De cada procedimiento de inducción, surgen múltiples clones de diferente calidad, y es esencial seleccionar los útiles para el uso médico. Como ha expresado el propio Yamanaka, su expectativa respecto a las iPS es ponerlas al servicio de la medicina. Aunque claramente, existen dificultades para el traslado a la investigación clínica: es preciso confirmar la diferenciación *in vitro*, la integridad del genoma y del epigenoma.

Nada más conocerse la reprogramación de células de adulto Rudolf Janisch, con su profundo conocimiento de la clonación en ratón, pudo comprobar que al menos en ratón las iPS propias podían ser utilizadas para curar una anemia que se presenta en humanos (Hanna, et al., 2007). Posteriormente, se están haciendo progresos hacia el uso de iPS en medicina regenerativa, por ejemplo para el tratamiento de la enfermedad Parkinson (Kriks, et al., 2011), la deficiencia de plaquetas (Takayama, et al., 2010), lesión de la médula espinal (Nori, et al., 2011), y la degeneración macular (Okamoto & Takahashi, 2011).

En el área de enfermedades neurodegenerativas como la Enfermedad de Parkinson se vienen ensayando implantes con células iPS en ratones con el fin de regenerar las neuronas dopaminérgicas dañadas (Politis & Lindvall, 2012). Sin embargo, existen todavía cuestionamientos para utilizar las terapias basadas en células troncales para los procesos neurodegenerativos (Lindvall & Kokaia, 2010). Más aún, se han logrado iPS tras corregir células somáticas de pacientes de anemia de Fanconi, capaces de dar progenitores hematopoyéticos de los linajes mieloide y eritroide normales, con futuro potencial terapéutico. Lo que supone la posible unión de la terapia genética con la terapia celular (Raya, et al., 2009).

Células iPS del paciente pueden ser usadas para recapitular fenotipos no sólo de enfermedades monogé-

nicas, sino también enfermedades de aparición tardía y poligénicas, como la enfermedad de Parkinson (Devine, et al., 2011), la enfermedad de Alzheimer (Israel, et al., 2012) (Yahata, et al., 2011) (Yagi, et al., 2011), y la esquizofrenia (Brennand, et al., 2011), para análisis tanto de los mecanismos de la enfermedad como de la investigación de nuevos potenciales tratamientos.

Por su parte, Douglas Melton, de la Universidad de Harvard, que inicialmente pensó en las células embrionarias para curar la diabetes, busca una terapia regenerativa espectacular: la reprogramación *in vivo*. Creó un sistema de trazado de las células que le ha permitido generar *in vivo* por transdiferenciación, células capaces de convertirse en productoras de insulina en los ratones (Zhou, Brown, Kanarek, Rajagopal, & Melton, 2008).

Hay varios ejemplos de conversión *in vitro* de fibroblastos a diversas células somáticas, tales como células neurales (Vierbuchen, Otermeier, Pang, Kokubo, Sudhof, & Wernig, 2010), hepatocitos (Huang, et al., 2011), miocitos cardíacos (Ieda, et al., 2010), y células progenitoras hematopoyéticas (Szabo, et al., 2010). El proceso de reprogramación directa es sencillo y rápido. Un obstáculo que sigue existiendo es cómo obtener una cantidad suficiente de "células diana" para aplicaciones posteriores. El mejor uso de esta nueva tecnología puede estar en la reprogramación directa *in situ* (Qian, et al., 2012).

En resumen, a corto plazo la reprogramación de células somáticas supone en primer lugar disponer de modelos para la investigación terapéutica de esperables beneficios médicos. A más largo plazo es posible que puedan usarse en terapia regenerativa. Y es posible que estos conocimientos precisos puedan generar terapias para el rejuvenecimiento *in vivo* de células somáticas a células progenitoras, por ejemplo las productoras de insulina.

9.2. Bancos de células pluripotenciales

Preparar para cada paciente unas células concretas a partir del rejuvenecimiento de las suyas, es largo, laborioso y costoso. Es necesario lograr un sistema de suministro de células pluripotenciales capaces de diferenciarse a cualquiera de los tipos que forman el cuerpo humano y que no sean rechazadas inmunológicamente por el paciente.

Recientemente, el gobierno japonés aprobó a Yamanaka un sueño largamente acariciado: la creación de líneas celulares a partir de las miles de muestras de sangre del cordón umbilical para su uso en medicina (Cyranoski D., 2012). Se trata 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. Necesitará muestras de unas 64.000 personas para encontrar los perfiles inmunológicos que cubran a la mayoría de la población. Utilizando muestras sangre de los ocho bancos de sangre de cordón de Japón, inutilizables para otros procedimientos médicos, tendría ya unas 29.000 muestras procesadas. La diversidad genética en Japón es relativamente baja y se necesitan menos muestras para abarcar los perfiles inmunológicos de la mayor parte de la población. En otros países será más difícil debido a la diversidad genética.

Japón está invirtiendo decenas de millones de dólares cada año en ocho proyectos a largo plazo para trasladar las terapias con iPS a la clínica, incluyendo el aporte de los EE.UU. 2,5 millones de dólares por año para la enfermedad de Parkinson en el centro de la Universidad de Kyoto que dirige Yamanaka. A este programa le faltan al menos tres años para entrar en la fase de ensayos clínicos.

La mayoría de los bancos iPS fuera de Japón se especializan en células de personas con enfermedades, para su uso en la investigación en lugar de usarlos para tratamientos. Por ejemplo, el Instituto de Medicina Regenerativa de California en San Francisco planea depositar unas 3.000 líneas de células para su distribución a los investigadores.

10. Conclusión: La racionalidad científica es imprescindible para la ética de la investigación en Biomedicina

Todos estas posibilidades que en relativamente poco tiempo han surgido de las iPS muestran de que manera es posible el progreso tecnológico a favor de la sociedad, cuando a la ciencia se le libera de presiones políticas, ideológicas y económicas. En definitiva, como afirma Yamanaka "los científicos deberían centrarse en la investigación, y los políticos y las empresas deben depender de la evidencia generada a partir de estudios científicos para informar di-

recciones futuras, más que en las opiniones de aquellos que no entienden completamente el campo" (Yamanaka, 2012).

A partir del estudio de el itinerario recorrido por Shin-ya Yamanaka se han podido inducir una serie de criterios generales. Estos criterios podrían servir de aprendizaje a la hora de aproximarse a un proyecto de investigación en Biomedicina. Además, pueden ayudar también a revisar la racionalidad con la que se han llevado adelante otras investigaciones referidas a las células troncales.

Se puede concluir que con el desarrollo de la tecnología de las iPS se abre un abanico de posibilidades que permitirán que en todas las áreas de trabajo con células troncales, se puedan obtener resultados acordes a las necesidades de la medicina regenerativa. Los avances que ya se vislumbran mediante el uso de las iPS responden a una forma de investigar con lógica científica, que toma a la ética como punto de partida.

Referencias

- Aiba, K., Nederezov, T., Piao, Y., Nishiyama, A., Matoba, R., Sharova, L., et al. (2009). Defining Developmental Potency and Cell Lineage Trajectories by Expression Profiling of Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells. *DNA Research*, 16, 73–80.
- Angenard, G., Muczynski, V., Coffigny, H., Duquenne, C., Frydman, R., Habert, R., et al. (2011). In vitro effects of Uranium on human fetal germ cells. *Reproductive Toxicology*, 31, 470–476.
- Angenard, G., Muczynski, V., Coffigny, H., Pairault, C., Duquenne, C., Frydman, R., et al. (2010). Cadmium Increases Human Fetal Germ Cell Apoptosis. *Environmental Health Perspectives*, 118 (3), 331-337.
- Apostolou, E., & Hochedlinger, K. (2011). iPS cells under attack. *Nature*, 474, 165-166.
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on Sox2 function. *Genes & Development*, 17, 126-140 .
- Baker, M. (2009). FAST AND FURIOUS. *Nature*, 458, 962-965.
- Ben-David, U., Kopper, O., & Benvenisty, N. (2012). Expanding the Boundaries of Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 10 (6), 666-677.

- Blanpain, C., Daley, G., Hochedlinger, K., Passegué, E., Ros-sant, J., & Yamanaka, S. (2012). Stem cells assessed. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13 (7), 471-476 .
- Blau, H. M. (1992). Differentiation requires continuous active control. *Annual Review of Biochemistry*, 61, 1213-1230.
- Blau, H., Chiu, C.-P., & Webster, C. (1983). Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable hetero-caryons. *Cell*, 32 (4), 1171-1180 .
- Blelloch, R., Venere, M., Yen, J., & Rhamalo-Santos, M. (2007). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells in the Absence of Drug Selection. *Cell Stem Cell*, 1 (3), 245-247.
- Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z., et al. (2011). Reference Maps of Human ES and iPS Cell Variation Enable High-Throughput Characterization of Pluripotent Cell Lines. *Cell*, 144 (3), 439-452.
- Boldajipour, B., & Raz, E. (2007). What Is Left Behind—Quality Control in Germ Cell Migration. *Science Signaling*, 2007 (383), 16.
- Boulting, G., Kiskinis, E., Croft, G., Amoroso, M., Oakley, D., Wainger, B., et al. (2011). A functionally characterized test set of human induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 29 (3), 279-283.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., et al. (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem cells. *Cell*, 122 (6), 947-956.
- Brennand, K., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhardt, C., Tran, N., Sangar, S., et al. (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 473 (7346), 221-225.
- Briggs, R., & King, T. (1952). Transplantation of living nuclei from blastula cell into enucleated frogs eggs. *PNAS*, 38, 455-463.
- Bucay, N., Yebra, M., Cirulli, V., Afrikanova, I., Kaido, T., Hayek, A., et al. (2009). A Novel Approach for the Derivation of Putative Primordial Germ Cells and Sertoli Cells from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 27 (1), 68-77.
- Burdon, T., Smith, A., & Savatier, P. (2002). Signalling, cell cycle and pluripotency in embryonic stem cells. *TRENDS in Cell Biology*, 12 (9), 432-438.
- Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J., & Smith, A. (1999). Suppression of SHP-2 and ERK Signalling Promotes Self-Renewal of Mouse Embryonic Stem Cells. *Developmental Biology*, 210 (1), 30-43 .
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., & Dalton, S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*, 132 (5), 885-896 .
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., et al. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113 (5), 643-655 .
- Check Hayden, E. (2011). The growing pains of pluripotency. *Nature*, 473, 272-274.
- Cheng, A. M., Saxton, T. M., Sakai, R., Kulkarni, S., Mbamalu, G., Vogel, W., et al. (1998). Mammalian Grb2 Regulates Multiple Steps in Embryonic Development and Malignant Transformation. *Cell*, 95 (6), 793-803 .
- Cheng, A., Saxton, T., Sakai, R., Kulkarni, S., Mbamalu, G., Vogel, W., et al. (1998). Mammalian Grb2 Regulates Multiple Steps in Embryonic Development and Malignant Transformation. *Cell*, 95 (11,), 793-803.
- Cheng, L., Hansen, N., Zhao, L., Du, Y., Zou, C., Donovan, F., et al. (2012). Low Incidence of DNA Sequence Variation in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated by Nonintegrating Plasmid Expression. *Cell Stem Cell*, 10 (3), 337-344.
- Chin, M., Mason, M., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., et al. (2009). Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures. *Cell Stem Cell*, 5 (1), 111-123.
- Chiu, C.-P., & Blau, H. M. (1984). Reprograming Cell Differentiation in absence of DNA Synthesis. *Cell*, 37 (3), 879-887.
- Cooke, H., & Saunders, P. (2002). Mouse models of male infertility . *Nature Reviews Genetics*, 3 (10), 790-801 .
- Coutts, S., Fulton, N., & Anderson, R. (2007). Environmental toxicant-induced germ cell apoptosis in the human fetal testis. *Human Reproduction*, 22 (11), 2912-2918.
- Cyranoski, D. (2008). Japan ramps up patent effort to keep iPS lead. *Nature*, 453 (7186), 406-408.

- Cyranoski, D. (2012). Stem-cell pioneer banks on future therapies. *Nature*, 488 (7410), 139.
- Cyranoski, D. (2008). Stem Cell; 5 things to know before jumping on the iPS bandwagon. *Nature*, 452 (7186), 406-408.
- Daley, G. (2010). Stem cells: roadmap to the clinic. *The Journal of Clinical Investigation*, 120 (1), 8-10.
- Daley, G., Lensch, M., Jaenisch, R., Meissner, A., Plath, K., & Yamanaka, S. (2009). Broader Implications of Defining Standards for the Pluripotency of iPSCs. *Cell Stem Cell*, 4 (3), 200-201.
- Davidson, R., Ephrussi, B., & Yamamoto, K. (1966). Regulation of pigment synthesis in mammalian cells, as studied by somatic hybridization. *PNAS*, 56 (5), 1437-1440.
- Deng, J., Shoemaker, R., Xie, B., Gore, A., LeProust, E., Antosiewicz-Bourget, J., et al. (2009). Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *PNAS*, 106 (4), 353-360.
- Deng, W., Aimone, J., & Gage, F. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nature Review of Neuroscience*, 11 (5), 339-350.
- Devine, M., Ryten, M., Vodicka, P., Thomson, A., Burdon, T., Houlden, H., et al. (2011). Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the α -synuclein locus. *Nature Communications*, 2 (440), 1-10.
- Dimos, J., Rodolfa, K., Niakan, K., Weisenthal, L., Mitsumoto, H., Chung, W., et al. (2008). Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be Differentiated into Motor Neurons. *Science*, 321 (5893), 1218-1221.
- Doi, A., Park, I.-H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M., Irizarry, R., et al. (2009). Differential methylation of tissue and cancerspecific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nature Genetics*, 41 (12), 1350-1353.
- Dolgin, E. (2011). Flaw in induced- stem-cell model. *Nature*, 470 (7332), 13.
- Duinsbergen, D., Eriksson, M., 't Hoen, P., Frisén, J., & Mikkers, H. (2008). Induced pluripotency with endogenous and inducible genes. *Experimental Cell Research*, 314 (17), 3255-3263.
- Ebert, A., & Svendsen, C. (2010). Stem Cell Model of Spinal Muscular Atrophy. *Archives of Neurology*, 67 (6), 665-669.
- Ebert, A., Yu, J., Rose Jr, F., Mattis, V., Lorson, C., Thomson, J., et al. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 457 (7227), 277-280.
- Eggan, K., Tackett, M., Baldwin, K., Osborne, J., Gogos, J., Chess, A., et al. (2004). Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature*, 428 (6978), 44-49.
- Eminli, S., Foudi, A., Stadtfeld, M., Maherali, N., Ahfeldt, T., Mostoslavsky, G., et al. (2009). Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nature Genetics*, 41 (9), 968-978.
- Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., & Konrad, H. (2008). Reprogramming of Neural Progenitor Cells into Induced Pluripotent Stem Cells in the Absence of Exogenous Sox2 Expression. *Stem Cells*, 26 (10), 2467-2474.
- Evans, M. (2011). Discovering Pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells. *Nature*, 476 (7356), 680-686.
- Evans, M. J. (1972). The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 28 (8), 163-& .
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292 (5819), 154-156.
- Ferlin, A., Raicu, F., Gatta, V., Zuccarello, D., Palka, G., & Foresta, C. (2007). Male infertility: role of genetic background. *Reproductive BioMedicine Online*, 14 (6), 734-745.
- Frank, N., Schatton, T., & Frank, M. (2010). The therapeutic promise of the cancer stem cell concept. *The Journal of Clinical Investigation*, 120 (1), 41-50.
- Fuchs, E. (2012). The Impact of Cell Culture on Stem Cell Research. *Cell Stem Cell*, 10 (6), 640-641.
- Gaspar-Maia, A., Alajem, A., Polesso, F., Sridharan, R., Mason, M., Heidersbach, A., et al. (2009). Chd1 regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*, 460 (7257), 863-U97.

- Geens, M., Sermon, K., Van de Velde, H., & Tournaye, H. (2011). Sertoli cell-conditioned medium induces germ cell differentiation in human embryonic stem cells. *Journal Assisted Reproduction Genetics*, 28 (5), 471–480.
- Gehring, W. (1967). Clonal analysis to determination dynamics in culture of imaginal disks of *Drosophila melanogaster*. *Developmental Biology*, 16 (5), 438-456.
- Gehring, W. J. (1996). The master control gene for morphogenesis and evolution of the eye. *Genes to Cells*, 1 (1), 11-15.
- Ghosh, Z., Wilson, K., Wu, Y., Hu, S., Quertermous, T., & Wu, J. (2010). Persistent Donor Cell Gene Expression among Human Induced Pluripotent Stem Cells Contributes to Differences with Human Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE*, 5 (2), 1-10.
- Gore, A., Li, Z., Fung, H.-L., Young, J., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., et al. (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*, 471 (7336), 61-67.
- Guenther, M., Frampton, G., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., et al. (2010). Chromatin Structure and Gene Expression Programs of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 7 (2), 249–257.
- Gurdon, J. (1962). The Transplantation of Nuclei between Two Species of *Xenopus*. *Developmental Biology*, 5 (1), 68-83.
- Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B., Beard, C., Wernig, M., et al. (2008). Direct Reprogramming of Terminally Differentiated Mature B Lymphocytes to Pluripotency. *Cell*, 133 (2), 250-264.
- Hanna, J., Saha, K., & Jaenisch, R. (2010). Pluripotency and Cellular Reprogramming: Facts, Hypotheses, Unresolved Issues. *Cell*, 143 (4), 508-525.
- Hanna, J., Saha, K., Pando, B., van Zon, J., Lengner, C., Creighton, M., et al. (2009). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*, 462 (7273), 595-601 .
- Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.-W., Meissner, A., Cassady, J., et al. (2007). Treatment of Sickle Cell Anemia Mouse Model with iPS Cells Generated from Autologous Skin. *Science*, 318 (5858), 1920-1923.
- Hardon, E. (1966). Constancy variation and type of determination and differentiation in cells from male genitalia of *Drosophila melanogaster* in permanent culture in vivo. *Developmental Biology*, 13 (3), 424-409.
- Hayashi, K., & Surani, A. (2009). Self-renewing epiblast stem cells exhibit continual delineation of germ cells with epigenetic reprogramming in vitro. *Development*, 136 (21), 3549-3556.
- Hayashi, K., Chuva de Sousa Lopes, S., & Surani, M. (2007). Germ Cell Specification in Mice. *Science*, 316 (5823), 394-396.
- Hayashi, K., Ogushi, S., Kurimoto, K., Shimamoto, S., Ohta, H., & Saitou, M. (2012). Offspring from Oocytes Derived from in Vitro Primordial Germ Cell-like Cells in Mice. *Science*, 338, 971-975.
- Hayashi, K., Ohta, H., Kurimoto, K., Aramaki, S., & Saitou, M. (2011). Reconstitution of the Mouse Germ Cell Specification Pathway in Culture by Pluripotent Stem Cells. *Cell*, 146 (4), 519–532.
- Hayashi, Y., Saitou, M., & Yamanaka, S. (2012). Germline development from human pluripotent stem cells toward disease modeling of infertility. *Fertility and Sterility*, 97 (6), 1250-1259.
- Hirami, Y., Osakada, F., Takahashi, K., Okita, K., Yamanaka, S., Ikeda, H., et al. (2009). Generation of retinal cells from mouse and human induced pluripotent stem cells. *Neuroscience Letters*, 458 (3), 126–131.
- Hochedlinger, K., & Jaenisch, R. (2002). Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature*, 415 (6875), 1035-1038.
- Hochedlinger, K., & Jaenisch, R. (2006). Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*, 441 (7097), 1061-1067.
- Howden, S., Gore, A., Li, Z., Fung, H.-L., Nisler, B., Nie, J., et al. (2011). Genetic correction and analysis of induced pluripotent stem cells from a patient with gyrate atrophy. *PNAS*, 108 (16), 6537-6542.
- Hoyer, P. (2005). Damage to ovarian development and function. *Cell and Tissue Research*, 322 (1), 99-106.
- Hu, B.-Y., Weick, J., Yu, J., Ma, L.-X., Zhang, X.-Q., Thomson, J., et al. (2010). Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmen-

- tal principles but with variable potency. *PNAS*, 107 (9), 4335–4340.
- Hua, J., & Sidhu, K. (2008). Recent Advances in the Derivation of Germ Cells from the Embryonic Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 17 (3), 399–411.
- Hua, J., Pan, S., Yang, C., Dong, W., Dou, Z., & Sidhu, K. (2009). Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. *Reproductive BioMedicine Online*, 19 (1), 99-105.
- Hua, J., Pan, S., Yang, C., Dong, W., Dou, Z., & Sidhu, K. (2009). Derivation of male germ cell-like lineage from human fetal bone marrow stem cells. *REPRODUCTIVE BIOMEDICINE ONLINE*, 19 (1), 99-105.
- Huang, P., He, Z., Ji, S., Sun, H., Xiang, D., Liu, C., et al. (2011). Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors. *Nature*, 475 (7356), 386-389.
- Hussein, S., Batada, N., Vuoristo, S., Ching, R., Autio, R., Närva, E., et al. (2011). Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature*, 471 (7336), 58-62.
- Ieda, M., Fu, J.-D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B., et al. (2010). Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes by Defined Factors. *Cell*, 142 (3), 375–386.
- Imamura, M., Aoi, T., Tokumaso, A., Mise, N., Abe, K., Shinya, Y., et al. (2010). Induction of Primordial Germ Cells From Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Derived From Adult Hepatocytes. *Molecular Reproduction & Development*, 77 (9), 802-811.
- Israel, M., Yuan, S., Bardy, C., Reyna, S., Mu, Y., Herrera, C., et al. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 482 (7384), 216-220.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yuhuka, O., Amit, M., et al. (2000). Differentiation of Human Embryonic Stem Cell into Embryoid Bodies Comprising the Three Embryonic Germ Layers. *Molecular Medicine*, 6 (2), 88-95.
- Judson, R., Babiarz, J., Venere, M., & Blleloch, R. (2009). Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nature Biotechnology*, 27 (5), 459-461.
- Kaufman, M. H., Robertson, E. J., Handyside, A. H., & Evans, M. J. (1983). Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 73 (2), 249-261.
- Kawakami, M., Sipp, D., & Kato, K. (2010). Regulatory Impacts on Stem Cell Research in Japan. *Cell Stem Cell*, 6 (5), 415-418.
- Kee, K., Flores, M., Cedars, M., & Reijo Pera, R. (2010). Human Primordial Germ Cell Formation Is Diminished by Exposure to Environmental Toxicants Acting through the AHR Signaling Pathway. *Toxicological Sciences*, 117 (1), 218–224.
- Kim, J., Ambasadhan, R., & Ding, S. (2012). Direct lineage reprogramming to neural cells. *Current Opinion in Neurobiology*, 22 (5), 778-784.
- Kim, J., Lengner, C., Kirak, O., Hanna, J., Cassady, J., Loldato, M., et al. (2011). Reprogramming of Postnatal Neurons into Induced Pluripotent Stem Cells by Defined Factors. *Stem Cells*, 29 (6), 992–1000.
- Kim, J., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., et al. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 454 (7204), 646-651.
- Kim, J.-E., O'Sullivan, M., Sanchez, C., Hwang, M., Israel, M., Brennand, K., et al. (2011). Investigating synapse formation and function using human pluripotent stem cell-derived neurons. *PNAS*, 108 (7), 3005–3010.
- Kiskinis, E., & Eggan, K. (2010). Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 120 (1), 51-59.
- Kriks, S., Shim, J.-W., Piao, J., Ganat, Y., Wakeman, D., Xie, Z., et al. (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature*, 480 (7378), 547-551.
- Lambrot, R., Coffigny, H., Pairault, C., Lécureuil, C., Frydman, R., Habert, R., et al. (2007). High Radiosensitivity of Germ Cells in Human Male Fetus. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92 (7), 2632–2639.
- Lambrot, R., Livera, G., Coffigny, H., Pairault, C., Frydman, R., Habert, R., et al. (2006). A new method for toxicity assays on human and mouse fetal testis. *Biochimie*, 88 (11), 1831–1835.

- Le Lievre, C. S., & Le Douarin, N. M. (1975). Mesenchymal derivatives of the neural crest: analysis of chimaeric quail and chick embryos. *Journal Embryology and Experimental Morphology*, 34 (1), 125-154.
- Lindvall, O., & Kokaia, Z. (2011). Stem Cell Research in Stroke How Far From the Clinic? *Stroke*, 42 (8), 2369-2375.
- Lindvall, O., & Kokaia, Z. (2010). Stem cells in human neurodegenerative disorders - time for clinical translation? *The Journal of Clinical Investigation*, 120 (1), 29-40.
- Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y., Hawkins, R., Nery, J., Hon, G., et al. (2011). Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *471 (7336)*, 68-73.
- Maherali, N., & Hochedlinger, K. (2008). Guidelines and Techniques for the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 3 (6), 595-605.
- Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., & Hochedlinger, K. (2008). A High-Efficiency System for the Generation and Study of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 3 (3), 340-345 .
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., et al. (2007). Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Remodeling and Widespread Tissue Contribution. *Cell Stem Cell*, 1 (1), 55-70.
- Marchetto, M., Yeo, G., Kainohana, O., Marsala, M., Gage, F., & Muotri, A. (2009). Transcriptional Signature and Memory Retention of Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE*, 4 (9), 1-12.
- Maruyama, M., Ishisaka, T., Nakagawa, M., & Yamanaka, S. (2005). Differential roles for Sox15 and Sox2 in transcriptional control of mouse embryonic stem cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 280 (26), 24371-24379.
- Mikkelsen, T. S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., et al. (2008). Dissecting Direct Reprogramming Through Integrative Genomic Analysis. *Nature*, 454 (7200), 49-54.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., et al. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency of mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113 (5), 631-642.
- Mitsui, T., Shumsky, J., Lepore, A., Murray, M., & Fischer, I. (2005). Transplantation of Neuronal and Glial Restricted Precursors into Contused Spinal Cord Improves Bladder and Motor Functions, Decreases Thermal Hypersensitivity, and Modifies Intraspinal Circuitry. *The Journal of Neuroscience*, 42 (25), 9624-9636.
- Newman, A., & Cooper, J. (2010). Lab-Specific Gene Expression Signatures in Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 7 (2), 258-262.
- Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klebe-Nebenius, D., Chambers, I., et al. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryos depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95 (3), 379-391.
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., & Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes & Development*, 12 (13), 2048-2060 .
- Niwa, H., Miyazaki, J.-i., & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct3/4 defines differentiation, differentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, 24 (4), 372-376.
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., et al. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoectoderm differentiation. *Cell*, 123 (5), 917-929.
- Nori, S., Okada, Y., Yasuda, A., Tsuji, O., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., et al. (2011). Grafted human-induced pluripotent stem-cell-derived neurospheres promote motor functional recovery after spinal cord injury in mice. *PNAS*, 108 (40), 16825-16830.
- Ohi, Y., Qin, H., Hong, C., Blouin, L., Polo, J., Guo, T., et al. (2011). Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPS cells. *Nature Cell Biology*, 13 (5), 541-549.
- O'Malley, J., Woltjen, K., & Kaji, K. (2009). New strategies to generate induced pluripotent stem cells. *Current Opinion in Biotechnology*, 20 (5), 516-521.
- Okamoto, S., & Takahashi, M. (2011). Induction of Retinal Pigment Epithelial Cells from Monkey iPS Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52 (12), 8785-8790.

- Osafune, K. (2010). In vitro regeneration of kidney from pluripotent stem cells. *Experimental Cell Research*, 316 (6), 2571-2577.
- Osafune, K. (2012). iPS Cell Technology–Based Research for the Treatment of Diabetic Nephropathy. *Seminars in Nephrology*, 32 (5), 479-485.
- Osafune, K., Caron, L., Borowiak, M., Martinez, R., Fitzgerald, C., Sato, Y., et al. (2008). Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nature Biotechnology*, 26 (3), 313-315.
- Park, H., Noh, E., Chung, H.-M., Kang, M.-J., Kim, E., & Park, S. (2012). Efficient Generation of Virus-Free iPS Cells Using Liposomal Magnetofection. *PLoS ONE*, 7 (9), 1-13.
- Park, I.-H., Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., et al. (2008). Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell*, 134 (5), 877-886.
- Park, I.-H., Zhao, R., West, J., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T., et al. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *451 (7175)*, 141-146.
- Park, T., Galic, Z., Conway, A., Lindgren, A., Han Handel, B., Magnusson, M., et al. (2009). Derivation of Primordial Germ Cells from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells Is Significantly Improved by Coculture with Human Fetal Gonadal Cells. *Stem Cells*, 27 (4), 783–795.
- Peerani, R., & Zandstra, P. (2010). Enabling stem cell therapies through synthetic stem cell–niche engineering. *The Journal of Clinical Investigation*, 120 (1), 60-70.
- Pera, M. (2001). Human pluripotent stem cells: a progress report. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11 (5), 595–599.
- Pera, M. (2001). Human pluripotent stem cells: a progress report. *Current Opinion in Genetics & Development*, 11 (5), 595–599.
- Pera, M. (2005). Stem cell culture, one step at a time. *Nature Methods*, 2 (3), 164-165.
- Pera, M. (2011). The dark side of induced pluripotency. *Nature*, 471 (7336), 46-47.
- Persani, L., Rossetti, R., & Cacciatore, C. (2010). Genes involved in human premature ovarian failure. *Journal of Molecular Endocrinology*, 45 (5), 257-279.
- Politis, M., & Lindvall, O. (2012). Clinical application of stem cell therapy in Parkinson's disease. *BMC Medicine*, 10 (1), 1-7.
- Qian, L., Huang, Y., Spencer, C., Foley, A., Vedantham, V., Liu, L., et al. (2012). In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*, 485, 593-598.
- Quinlan, A., Boland, M., Leibowitz, M., Shumilina, S., Pehrson, S., Baldwin, K., et al. (2011). Genome Sequencing of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Reveals Retroelement Stability and Infrequent DNA Rearrangement during Reprogramming. *Cell Stem Cell*, 9, 366–373.
- Raya, Á., Rodríguez-Piza, I., Guenechea, G., Vassena, R., Navarro, S., Barrero, M. J., et al. (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*, 460 (7251), 53-59.
- Richardson, B., & Lehmann, R. (2010). Mechanisms guiding primordial germ cell migration: strategies from different organisms. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11 (1), 37-49.
- Rust, J., Ritchie, W., McWhir, J., & Wilmunt, I. (1993). Developmental Potential of Nuclei from sheep embryonic ectoderm. *Theriogenology*, 39 (1), 300.
- Saha, B., Jaber, M., & Gaillard, A. (2012). Potentials of endogenous neural stem cells in cortical repair. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 6 (14), 1-10.
- Saha, K., & Jaenisch, R. (2009). Technical Challenges in Using Human Induced Pluripotent Stem Cells to Model Disease. *Cell Stem Cell*, 5 (6), 584-595 .
- Saitou, M., & Yamaji, M. (2010). Germ cell specification in mice: signaling, transcription regulation, and epigenetic consequences. *Reproduction*, 139 (6), 931–942.
- Sancho-Martinez, I., & Izpisua Belmonte, J. (2013). Will SCNT-ESCs Be Better than iPSCs for Personalized Regenerative Medicine? *Cell Stem Cell*, 13, 141-142.
- Sasaki, H., & Matsui, Y. (2008). Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nature Genetics*, 9 (2), 129-140.
- Schneuwly, S., Klemenz, R., & Gehring, W. (1987). Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic

- expression of the homoeotic gene *Antennapedia*. *Nature*, 325 (6107), 816-818.
- Selvaraj, V., Plane, J., Williams, A., & Deng, W. (2010). Switching cell fate: the remarkable rise of induced pluripotent stem cells and lineage reprogramming technologies. *Trends in Biotechnology*, 28 (4), 214-223.
- Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donova, P. J., et al. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *PNAS*, 95 (23), 13726-13731.
- Shelling, A. (2010). Premature ovarian failure. *Reproduction*, 140.
- Silva, J., & Smith, A. (2008). Capturing Pluripotency. *Cell*, 132.
- Sinmonsson, S., & Gurdon, J. (2004). DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nature Cell Biology*, 6 (10), 984-990.
- Si-Tayeb, K., Duclos-Vallée, J.-C., & Petit, M.-A. (2012). Hepatocyte-like cells differentiated from human induced pluripotent stem cells (iHLCs) are permissive to hepatitis C virus (HCV) infection: HCV study gets personal. *Journal of Hepatology*, 57, 689-691.
- Smith, A. (2005). The Battlefield of Pluripotency. *Cell*, 123, 757-760.
- Smith, A., & Hooper, M. (1987). Buffalo Rat Liver Cells Produce a Diffusible Activity Which Inhibits the Differentiation of Murine Embryonal Carcinoma and Embryonic Stem Cells. *Developmental Biology*, 121, 1-9.
- Smith, A., Nichols, J., Robertson, M., & Rathjen, P. (1992). Differentiation Inhibiting Activity (DIALIF) and Mouse Development. *Developmental Biology*, 151, 339-351.
- Sridharan, R., Tchieu, J., Mason, M. J., Yachechko, R., Kuoy, E., Horvath, S., et al. (2009). Role of the Murine Reprogramming Factors in the Induction of Pluripotency. *Cell*, 136.
- Stadtfield, M., & Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and application. *Genes & Development*, 24.
- Stevens, L. C., & Little, C. C. (1954). Spontaneous testicular teratoma in an inbred strain of mice. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 40 (11), 1080-1087.
- Sumi, T., Tsuneyoshi, N., Nakatsuji, N., & Suemori, H. (2007). Apoptosis and differentiation of human embryonic stem cells induced by sustained activation of c-Myc. *Oncogene*, 26 (38), 5564-5576.
- Szabo, E., Rampalli, S., Risueño, R., Schnerch, A., Mitchell, R., Fiebig-Comyn, A., et al. (2010). Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature*, 468 (7323), 521-526.
- Tachibana, M., Amato, P., Sparman, M., Gutierrez, N., Tippner-Hedges, R., Ma, H., et al. (2013). Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer. *Cell*, 153 (5).
- Takahashi, K. (2012). Cellular reprogramming – lowering gravity on Waddington’s epigenetic landscape. *Journal of Cell Science*, 125 (11), 2553-2560.
- Takahashi, K. (2010). Direct reprogramming 101. *Development, Growth & Differentiation*, 52 (3), 319-333.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126 (4), 663-676.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126 (4), 663-676.
- Takahashi, K., Mitsui, K., & Yamanaka, S. (2003). Role of ERas in promoting tumor-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature*, 423 (6939), 541-545.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., et al. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131 (11), 861-872.
- Takayama, N., Nishimura, S., Nakamura, S., Shimizu, T., Ohnishi, R., Endo, H., et al. (2010). Transient activation of c-MYC expression is critical for efficient platelet generation from human induced pluripotent stem cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 207 (13), 2817-2830.
- Tanaka, T., Takahashi, K., Yamane, M., Tomida, S., Nakamura, S., Oshima, K., et al. (2012). Induced pluripo-

- tent stem cells from CINCA syndrome patients as a model for dissecting somatic mosaicism and drug discovery. *Blood*, 120 (6), 1299-1308.
- Tanaka, T., Tohyama, S., Murata, M., Nomura, F., Kaneko, T., Chen, H., et al. (2009). *n vitro* pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 385.
- Taura, D., Noguchi, M., Sone, M., Hosoda, K., Mori, E., Okada, Y., et al. (2009). Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: Comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Letters*, 583 (6), 1029–1033.
- Tedesco, F., Dellavalle, A., Diaz-Manera, J., Messina, G., & Cossu, G. (2010). Repairing skeletal muscle: regenerative potential of skeletal muscle stem cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 120 (1), 11-19.
- Thomson, A., Iskovit-Eldor, J., & Shapiro, S. S. (1998). Embryonic stem line derived from human blastocysts. *Science*, 282 (5391), 1145-1147.
- Tobin, S., & Kim, K. (2012). Generating pluripotent stem cells: Differential epigenetic changes during cellular reprogramming. *FEBS Letters*, 586 (18), 2874-2881.
- Tokuzawa, Y., Kaiho, E., Maruyama, M., Takahashi, K., Mitsui, K., Maeda, M., et al. (2003). Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for Embryonic Stem Cell self-renewal and mouse development. *Molecular and Cellular Biology*, 23 (8), 2699-2708.
- Van Thuan, N., Kishigami, S., & Wakayama, T. (2010). How to improve the success rate of mouse cloning technology. *Journal of Reproduction and Development*, 56 (1), 20-30.
- Vierbuchen, T., Otermeier, A., Pang, Z. P., Kokubo, Y., Sudhof, T. C., & Wernig, M. (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*, 463 (7284), 1035-1041.
- Walsh, T., Pera, R., & Turek, P. (2009). The Genetics of Male Infertility. *Seminars in Reproductive Medicine*, 27 (2), 124-136.
- Wang, Y., & Armstrong, S. (2008). Cancer: Inappropriate Expression of Stem Cell Programs? *Cell Stem Cell*, 2 (4), 297-299.
- Wang, Y., & Blueloch, R. (2009). Cell Cycle Regulation by MicroRNAs in Embryonic Stem Cells. *Cancer Research*, 69 (10), 4093-4096.
- Ward, C., Barrow, K., & Stern, P. (2004). Significant variations in differentiation properties between independent mouse ES cell lines cultured under defined conditions. *Experimental Cell Research*, 293 (2), 229-238.
- Wernig, M., Legner, C. J., Hanna, J., Lodato, M. A., Stein, E., Foreman, R., et al. (2008). A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nature Biotechnology*, 26 (8), 916-924 .
- Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J., & Jaenisch, R. (2008). c-Myc Is Dispensable for Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2 (1), 10-12.
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hodchedlinger, K., et al. (2007). In vitro reprogramming fibroblast into pluripotent ES-cell-like state. *Nature*, 448 (7151), 318-324.
- West, F., Machacek, D., Boyd, N., Pandiyan, K., Robbins, K., & Stive, S. (2008). Enrichment and Differentiation of Human Germ-Like Cells Mediated by Feeder Cells and Basic Fibroblast Growth Factor Signaling. *Stem cells*, 26 (11), 2768–2776.
- Williams, R. (2013). Shinya Yamanaka : Purveyor of Pluripotency. *Circulation Research*, 112 (2), 233-235.
- Wilmot, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. (1997). Viable Offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385 (6619), 810-813.
- Wong, D., Liu, H., Ridky, T., Cassarino, D., Segal, E., & Chang, H. (2008). Module Map of Stem Cell Genes Guides Creation of Epithelial Cancer Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 2 (4), 333-344.
- Wong, E., & Cheng, C. (2011). Impacts of environmental toxicants on male reproductive dysfunction. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32 (5), 290-299.
- Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Yoshizaki, T., et al. (2011). Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Human Molecular Genetics*, 20 (23), 4530–4539.
- Yagi, T., Kosakai, A., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., et al. (2012). Establishment of Induced Plu-

- ripotent Stem Cells from Centenarians for Neurodegenerative Disease Research. *PLoS ONE*, 7 (7), 1-7.
- Yahata, N., Asai, M., Kitaoka, S., Takahashi, K., Asaka, I., Hioki, H., et al. (2011). Anti-Abeta Drug Screening Platform Using Human iPS Cell- Derived Neurons for the Treatment of Alzheimer's Disease. *PLoS ONE*, 6 (9), 1-11.
- Yamanaka, S. (2009). A Fresh Look at iPS Cells. *Cell*, 137 (1), 13-17.
- Yamanaka, S. (2009). Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature*, 460 (7251), 49 -52.
- Yamanaka, S. (2012). Induced pluripotent stem cells: past, present and future. *Cell Stem Cell*, 10 (6), 678-684.
- Yamanaka, S. (2010). Patient-Specific Pluripotent Stem Cells Become Even More Accessible. *Cell Stem Cell*, 7 (1), 1-2.
- Yamanaka, S. (2008). Pluripotency and nuclear reprogramming. *Philosophical transaction of the royal society biological sciences*, 363 (1500), 2079 -2087.
- Yamanaka, S. (2007). Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 1 (1), 39-49.
- Yamanata, S., & Blau, H. M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*, 465 (7299), 704-712.
- Yang, J.-R., Lin, Y.-T., & Liao, C.-H. (2011). Application of Embryonic Stem Cells on Parkinson's Disease Therapy. *Genomic Medicine and Biomarker Health*, 3 (1), 17-26.
- Yang, X., Smith, S., Tian, X., Lewin, H., Renard, J.-P., & Wakayama, T. (2007). Nuclear reprogramming of clones embryos and its implicatios for therapeutic cloning. *Nature Genetics*, 39 (3), 295-302.
- Yang, Z., & Wu, J. (2007). Micro RNAs and regenerative medicine. *DNA and Cell Biology*, 26 (4), 257.
- Young, M., Larson, D., Sun, C.-W., George, D., Ding, L., Miller, C., et al. (2012). Background Mutations in Parental Cells Account for Most of the Genetic Heterogeneity of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 10, 570-582.
- Yu, J., & Thomson, J. (2008). Pluripotent stem cell lines. *Genes & development*, 22 (15), 1987-1997.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I., et al. (2009). Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science*, 324 (5928), 797-801.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., et al. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*, 318 (5858), 1917 -1920.
- Zhang, F., Citra, F., & Wang, D.-A. (2011). Prospects of Induced Pluripotent Stem Cell Technology in Regenerative Medicine. *Tissue Engineering, 17-B* (2), 115-124.
- Zhang, J., Wilson, G., Soerens, A., Koonce, C., Yu, J., Palecek, S., et al. (2009). Functional Cardiomyocytes Derived From Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation Research*, 104 (4), E30-E41.
- Zhang, S.-C., Wernig, M., Duncan, I., Brüstle, O., & Thomson, J. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19 (12), 1129-1133.
- Zhang, X.-Y., Yamanaka, S., Kim, S., Miura, K., & Iwao, H. (1999). NAT1, a homologue of the eukaryotic translation initiation factor 4G, is essential for cell differentiation and mouse development. *Japanese Journal of Pharmacology*, 79 (SUPPL.1), 163P .
- Zhao, T., Zhang, Z.-N., Rong, Z., & Xu, Y. (2011). Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 474 (7350), 212-215.
- Zhou, H., & Ding, S. (2010). Evolution of induced pluripotent stem cell technology. *Current Opinion in Hematology 2010*, 17:276 – 280.
- Zhou, H., Wu, S., Young Joo, J., Zhu, S., Wook Han, D., Lin, T., et al. (2009). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell*, 4 (5), 381-384.
- Zhou, Q., & Melton, D. (2008). Extreme Makeover: Converting One Cell into Another. *Cell Stem Cell*, 3 (4), 382-388.
- Zhou, Q., Brown, J., Kanarek, A., Rajagopal, J., & Melton, D. (2008). In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to b-cells. *Nature*, 455 (7213), 637-632.
- Zwaka, T. (2010). Stem Cells Troublesome memories. *Nature*, 467 (7313), 280-281.