

CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES: QUÈ EN SABEM DESPRÉS DE TRENTA ANYS D'INVESTIGACIÓ?

NÚRIA MONTSERRAT,¹ BEGOÑA ARAN¹ I JUAN CARLOS IZPISÚA^{1,2}

¹ Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona

² Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, Califòrnia, Estats Units

Adreça per a la correspondència: Juan Carlos Izpisúa Belmonte. Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona. C. del Dr. Aiguader, 88, 7è. 08003 Barcelona.
Tel.: 933 160 446. Adreça electrònica: izpisua@cmrb.eu.

RESUM

L'aïllament i derivació de les cèl·lules mare embrionàries humanes (CME) l'any 1998 va generar grans expectatives en el camp de la teràpia cel·lular. Les CME presentaven la capacitat de poder dividir-se infinitament i el potencial necessari per diferenciar-se a qualsevol tipus cel·lular del nostre cos. Malauradament, després de més de vint anys d'investigació, l'aplicació clínica encara presenta problemes relacionats amb la utilització d'embrions humans, el rebuig immunitari després del trasplantament i la formació de tumors. Així doncs, un dels principals objectius en el camp de la medicina regenerativa és l'obtenció de CME a partir de cèl·lules somàtiques de pacients. L'any 2006 es va descriure, per primera vegada, que cèl·lules totalment diferenciades es podien reprogramar a cèl·lules semblants a les CME. Aquestes CME resultants presentaven les característiques típiques de les CME i, finalment, evitaven els problemes relacionats amb el rebuig immunitari i la utilització d'embrions humans. Tot i així, les tècniques utilitzades en els últims cinc anys no són encara les adequades per a l'ús immediat d'aquestes cèl·lules en aplicacions clíniques. Els propers anys seran fonamentals per al desenvolupament d'estratègies que en permetin l'obtenció de manera segura, i esdevinguin l'alternativa ideal en les teràpies de substitució cel·lular i el modelatge de malalties *in vitro*.

Paraules clau: cèl·lula mare embrionària, pluripotència, cèl·lula mare amb pluripotència induïda, teràpia cel·lular.

HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS: WHAT DO WE KNOW AFTER THIRTY YEARS OF RESEARCH?

SUMMARY

The isolation and derivation of human embryonic stem cells (hESCs) in 1998 attracted significant attention in the regenerative medicine field. Among other properties, these cells possessed the dual ability to self-renew and differentiate into all the cell types of the body. These characteristics suggest that hESCs hold great potential for application in regenerative medicine. However, after more than twenty years of intense research, their clinical application still shows many concerns regarding the use of human embryos, tissue rejection after transplantation, and tumour formation. Thus, one of the ultimate goals in regenerative medicine is the generation of pluripotent hESCs directly from somatic cells obtained from patients. A breakthrough appeared when fully differentiated cells were reprogrammed for the first time in 2006 into ES-like cells. The resulting ES-like cells exerts all the characteristics intrinsic to ESC biology and finally could overcome the issue related with immune rejection after transplantation and the use of human embryos for research. Nevertheless, most of the techniques used to reprogram human somatic cells are still not adaptable for immediate clinical applications. Improvements in their safe derivation and validation will bring them one step closer for becoming the ideal alternative in cell-replacement therapies and disease modelling *in vitro*.

Key words: human embryonic stem cell, pluripotency, induced pluripotent stem cell, cell therapy.

TOTIPOTÈNCIA, PLURIPOTÈNCIA I MULTIPOTÈNCIA: CONCEPTES BÀSICS QUE DEFINEIXEN ELS DIFERENTS TIPUS DE CÈL·LULES MARE

El desenvolupament embrionari en els mamífers comença en el moment en què l'embrió totipotent és capaç d'esdevenir tots els tipus cel·lulars especialitzats que conformaran l'animal adult. Així doncs, el terme *totipotència* fa referència a la capacitat que té una cèl·lula de dividir-se i donar lloc a tots els tipus cel·lulars que trobem a l'organisme, tenint en compte també els teixits extraembrionaris (placenta i còrion). El desenvolupament embrionari en l'ésser humà comença en el moment en què l'òcít és fecundat per l'espermatozoide i dona

lloc al zigot, que és totipotent, ja que aquesta única cèl·lula té el potencial d'esdevenir un embrió que contindrà tots els tipus cel·lulars que donaran lloc a un ésser viu. Direm, doncs, que una cèl·lula totipotent és aquella que pot donar lloc a un organisme sencer.

Una cèl·lula pluripotent pot donar lloc a qualsevol tipus cel·lular, fetal o adult, però no pot esdevenir un fetus o animal adult. Finalment, una cèl·lula multipotent pot esdevenir únicament alguns tipus cel·lulars similars al teixit en el qual resideix.

Les cèl·lules mare (CM) són cèl·lules diferenciades que trobem en alguns teixits adults (CMA) i en els embrions (CM embrionàries; CME), així com en alguns teixits fetals com ara el cordó umbilical i la placenta (CMF). Per definició, les CM són

pluri o multipotents (en alguns casos totipotents) i poden donar lloc a diferents tipus cel·lulars atenent al seu origen i plasticitat. Les CM es caracteritzen per presentar dos requisits clau: el primer, és que presenten potencial d'autorenovació, és a dir, una cèl·lula es divideix donant lloc a dues cèl·lules filles idèntiques amb un potencial proliferatiu indefinit; el segon, que tenen la capacitat de donar lloc a altres tipus cel·lulars a través de processos de diferenciació.

Les CME es presenten com una eina única en l'àrea de la biomedicina a causa de les seves possibles aplicacions tant clíniques com terapèutiques. Poden ser utilitzades *in vitro*, amb l'objectiu d'entendre els

processos implicats en el desenvolupament, o *in vivo*, i esdevenen una font única per a estudis de regeneració tissular i teràpies de substitució cel·lular.

Les CMA són cèl·lules indiferenciades que es troben en teixits i òrgans adults i que es poden diferenciar en les cèl·lules especialitzades d'aquell teixit o òrgan. La seva freqüència i capacitat de proliferació *in vitro* és baixa. Un exemple serien les cèl·lules mare hematopoètiques (CMH) que donen lloc a tots els tipus de cèl·lules de la sang. La primera aplicació terapèutica amb cèl·lules mare adultes es va dur a terme el 1968 amb el primer trasplantament de medulla òssia. Les cèl·lules mare mesenqui-

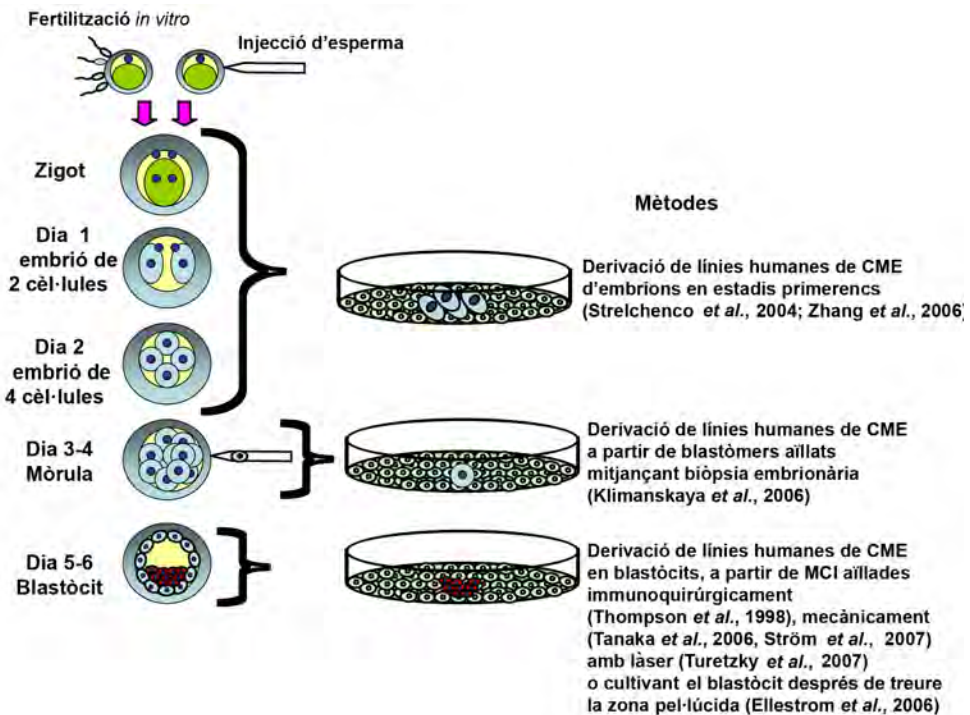


FIGURA 1. Mètodes de derivació per cèl·lules embrionàries humanes. A partir de mostres que provenen de donacions anònimes de processos com ara la fertilització *in vitro* o la injecció d'esperma en l'òvul, diferents grups de recerca han descrit la derivació de cèl·lules embrionàries humanes. L'esquema mostra els diferents moments en el desenvolupament embrionari *in vitro*, en què els diferents autors han derivat línies de cèl·lules mare embrionàries (CME). Esquema adaptat de Lei *et al.* (2007).

màtiques (CMM) representen un altre tipus de CMA fàcilment aïllables i expansibles. Els resultats preliminars de molts dels assaigs clínics recents amb aquestes cèl·lules són prometedors i apunten efectes beneficiosos en el tractament d'algunes malalties com la malaltia de Crohn, la malaltia de l'empelt contra l'hoste o la regeneració d'alguns teixits com os i cartílag.

Les CMF poden obtenir-se a partir del cordó umbilical o bé de teixits fetals procedents d'avortaments. El trasplantament de sang de cordó umbilical és una teràpia amb CMF totalment consolidada i establerta des de fa molts anys.

CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES: DERIVACIÓ I CULTIU

Les CME humanes les van descriure Thomson *et al.* (1998), i són cèl·lules pluripotents que tenen la capacitat de donar lloc a qualsevol tipus cel·lular dels tres llinatges germinals (ectoderma, endoderma, mesoderma). En aquest primer treball Thomson *et al.* (1998) van derivar les CME a partir de la massa cel·lular interna (MCI) de l'embrió. El cultiu d'aquesta estructura *in vitro* es va dur a terme sobre una capa de cèl·lules nodradores. Aquestes cèl·lules eren encarregades de segregar determinats factors de creixement al medi de cultiu i permetien el creixement de les cèl·lules de la MCI per donar lloc a una línia de CME.

En aquests últims trenta anys de recerca hem après que les CME tenen capacitat d'autorenovació i que la seva pluripotència es manté mitjançant factors transcripcionals expressats de manera endògena. En les condicions de cultius adients, aquestes cèl·lules es poden mantenir indiferenciades indefinidament. *In vivo*, en l'embrió, les cèl·lules de la MCI existeixen de manera transiènt; a mesura que el programa del desen-

volupament avança es diferencien en cèl·lules de l'estadi embrionari següent.

S'han establert diferents metodologies per a la derivació de CME. Els protocols són diferents depenent també de l'estadi embrionari en el qual fem la derivació. Inicialment, Thomson *et al.* (1998) van aïllar la MCI de l'embrió utilitzant anticossos (immunocirurgia). Altres autors, per tal d'evitar l'ús de components d'origen animal, que limitarien l'ús terapèutic d'aquestes cèl·lules, van proposat aïllar la MCI mecànicament (Ström *et al.*, 2007), mitjançant làser (Turetsky *et al.*, 2008), o fins i tot, sembrant el blastòcit sencer (Heins *et al.*, 2004; Raya *et al.*, 2008). Hi ha, però, altres opcions per a la derivació de CME com ara la utilització d'embrions primerencs (Zhang *et al.*, 2006), en estat de mòrula (Strelchenko *et al.*, 2004), així com de blastòmers aïllats (Klimanskaya *et al.*, 2006). En la majoria dels casos s'han utilitzat cèl·lules nodradores per a la derivació de les CME, tot i que en els darrers anys s'ha descrit l'ús de matrius extracel·lulars (Klimanskaya *et al.*, 2005; Hasegawa, 2010) (vegeu la figura 1).

Actualment es calcula que hi ha al voltant de mil línies de CME humanes (Borstlap *et al.* 2008; Löser *et al.*, 2010; per a més informació: www.hescreg.eu). La majoria de les línies de CME existents procedeixen d'embrions donats per les parelles sotmeses a cicles de fecundació *in vitro* (FIV), que ja no necessiten utilitzar-los amb finalitat reproductiva i opten per donar-los voluntàriament per a recerca. En molts casos es tracta d'embrions congelats i han de ser, per tant, descongelats i cultivats abans d'utilitzar-los per a la derivació.

L'eficàcia de derivació varia entre els diferents autors segons el mètode utilitzat (Chen *et al.*, 2009; Aran *et al.*, 2010), la qualitat embrionària (Zhang *et al.*, 2006; Lerou *et al.*, 2008) o de si la derivació de les CME

es fa a partir d'embrions frescos o congelats (Mitalipova *et al.*, 2003; Sjögren *et al.*, 2004).

CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES: CARACTERITZACIÓ I DIFERENCIACIÓ

Així doncs, les CME es poden derivar mitjançant diferents tècniques a partir de diferents moments durant el desenvolupament embrionari. Aquestes tècniques també impliquen la utilització de diferents substrats. Independentment de com s'ha derivat la línia de CME en el laboratori, aquestes cèl·lules expressen marcadors específics, que són idèntics als que expressen les cèl·lules pluripotents transitòries de l'embrió. La identificació d'aquests marcadors ens ajuda a caracteritzar les nostres línies de CME en el laboratori. Entre aquest grup trobem antígens específics d'estadi embrionari, com ara els glicolípidis SSEA-3 o SSEA-4, antígens sulfatats com Tra-1-60 i Tra-1-81 (vegeu la figura 2a), i també activitats enzimàtiques com la fosfatasa alcalina (vegeu la figura 2b) i la telomerasa.

Una altra característica de les CME és que aquestes expressen típicament uns gens responsables de mantenir i assegurar la pluripotència cel·lular. Entre d'altres, s'inclouen els factors transcripcionals *OCT4*, *SOX2* i *NANOG*. Aquests, però, són ràpidament silenciats quan les cèl·lules es diferencien.

La diferenciació és el procés pel qual una cèl·lula indiferenciada es transforma en una cèl·lula especialitzada (diferenciada) d'un determinat tipus cel·lular. Durant el procés embrionari es produeixen processos de diferenciació que poden emular-se en el laboratori. Determinades condicions de cultiu dirigiran les CME a diferenciar-se a una o altra línia germinal, i després, envers les

diferents cèl·lules de l'organisme. Les diferents publicacions en el camp de les CME han demostrat que aquestes s'han diferenciat en més dels dos-cents tipus cel·lulars presents en el nostre organisme.

Per dur a terme una exhaustiva caracterització de qualsevol línia de CME és necessari valorar-ne la capacitat de diferenciació tant *in vitro* com *in vivo*. Així doncs, en les condicions de cultiu adequades les CME proliferen de manera indefinida i es mantenen indiferenciades, fet que suggereix que l'activitat transcripcional i els reguladors epigenètics responsables de mantenir la pluripotència es poden mantenir *in vitro* en les CME. Quan aquestes condicions de cultiu canvien, i es perden aquests senyals encarregats de mantenir la pluripotència en CME, aquestes es diferencien *in vitro* en un altre tipus cel·lular (vegeu la figura 3a), igual que les cèl·lules de la MCI ho fan *in vivo*. La diferenciació *in vitro* a les tres capes germinals de l'embrió es fa a través de protocols que consisteixen a aplicar diferents medis de cultiu que contenen factors de creixement i vitamines encarregades de dirigir la diferenciació de les CME al tipus cel·lular que ens interessa.

La diferenciació *in vivo* (vegeu la figura 3b) es valora induint la formació de teratomes (tumors que contenen cèl·lules representants de les tres germinals de l'embrió), mitjançant la injecció de CME en ratolins immunodeprimits, i així avaluar si aquestes cèl·lules són capaces de diferenciar-se en diferents tipus cel·lulars procedents de les tres línies germinals (ectoderma, endoderma i mesoderma).

Un altre requisit fonamental de les CME és l'anàlisi del cariotip (vegeu la figura 3c). Tot i que alguns treballs han documentat que aquest es manté normal durant molt de temps (Buzzard *et al.*, 2004; Caisander *et al.*, 2006), altres autors han descrit alteracions del cariotip al llarg del cultiu (Cowan

et al., 2004). Algunes trisomies, com les dels cromosomes 12 i 17, poden esdevenir favorables en cultiu, i conferir a les cèl·lules més potencial proliferatiu, però aquestes tenen tendència a fixar-se (Draper *et al.*, 2004; Spits *et al.*, 2008). Per aquest motiu es recomana fer anàlisis del cariotip de les línies CME cada vint passes en cultiu aproximadament.

Així doncs, l'anàlisi de l'expressió de marcadors típics de pluripotència, l'avaluació del potencial de diferenciació *in vitro* i *in vivo*, i l'anàlisi del cariotip, són requisits fonamentals per a la caracterització de les

CME en els laboratoris d'arreu del món. Al mateix temps, aquests assajos esdevenen criteris obligatoris quan volem enregistrar les nostres línies de CME en els bancs de CME.

BANC DE LÍNIES DE CÈL·LULES MARE

El nombre de línies de CME creix ràpidament i és necessària la creació de bancs i registres que recullin la informació relativa a les línies disponibles. Són imprescindibles

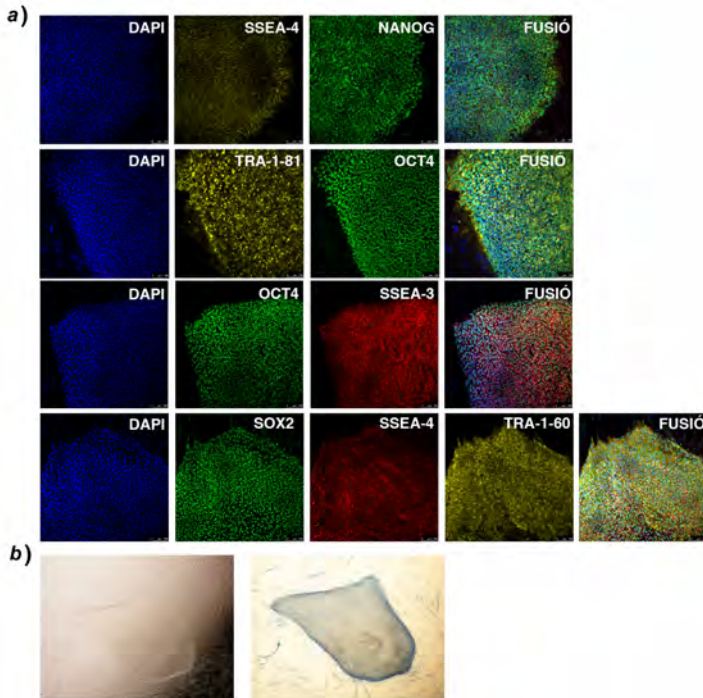


FIGURA 2. a) Expressió de marcadors de pluripotència en una línia de cèl·lules mare embrionàries (CME) derivada en el Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMR[B]). Les CME expressen els marcadors de superfície SSEA-4, TRA-1-81, SSEA-3 i TRA-1-60, i els marcadors nuclears NANOG, OCT4 i SOX2. Els nuclis, visualitzats en blau, es van tenyir amb 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI). b) Detecció d'activitat fosfatasa alcalina en una línia de CME. Les CME cultivades en presència d'una monocapa de cèl·lules nodrïdores presenten activitat enzimàtica fosfatasa alcalina (blau).

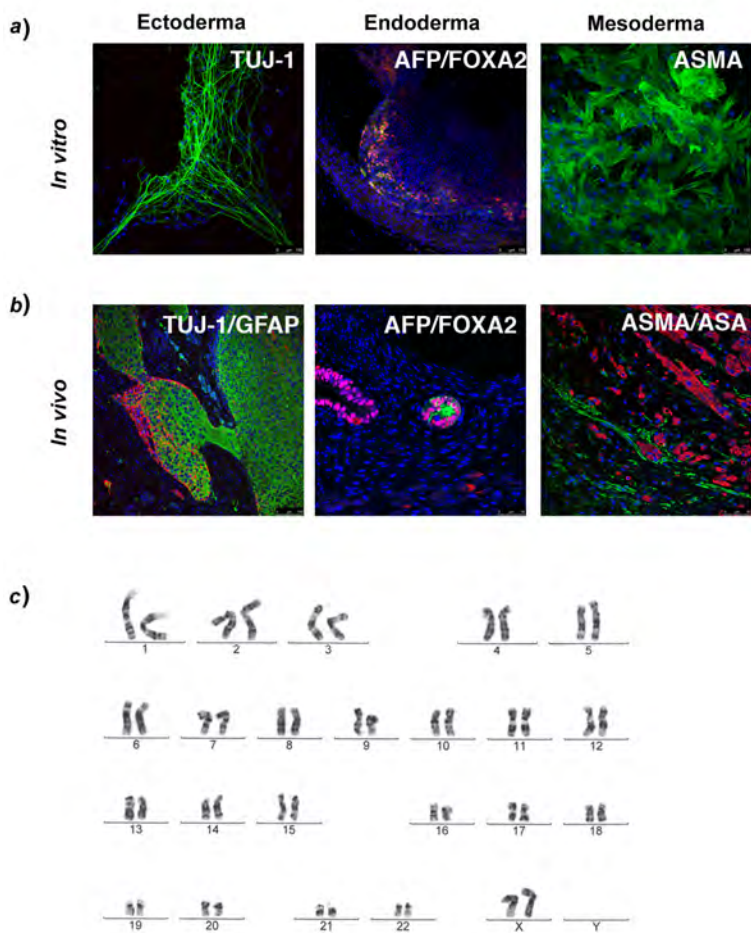


FIGURA 3. *a)* Les CME es manipulen en el laboratori mitjançant protocols específics per a la diferenciació *in vitro* en les tres capes germinals embrionàries. Ectoderma: en verd es mostra la tinció per a la proteïna β -tubulina de classe III específica de neurones (TUJ-1). Endoderma: en verd es mostra la tinció citoplasmàtica per a la proteïna α fetal (AFP) i en vermell la tinció nuclear per a la proteïna Forkhead box 2 (FOXA2). Mesoderma: en verd es mostra la tinció per a actina α sarcomèrica (ASMA). *b)* Les CME són injectades en els testicles de ratolins immunodeprimits amb l'objectiu d'analitzar el seu potencial de diferenciació *in vivo* en les tres capes germinals embrionàries. Ectoderma: en verd es mostra la tinció per a la proteïna β -tubulina de classe III específica de neurones (TUJ-1) i en vermell per a la proteïna fibrillar àcida de la glia (GFAP). Endoderma: en verd es mostra la tinció citoplasmàtica per a la proteïna α fetal (AFP) i en vermell la tinció nuclear de la proteïna Forkhead box 2 (FOXA2). Mesoderma: en verd es mostra la tinció per a la proteïna actina muscular α sarcomèrica (ASMA) i en vermell la tinció per a la proteïna α actina muscular (ASA). *c)* L'anàlisi de cariotip de la nostra línia CME mostra que aquesta és normal, diploide i femenina.

bles per als investigadors que necessiten informació sobre les línies existents i les seves característiques. La funció dels bancs de línies cel·lulars és expandir, caracteritzar, preservar i posar a disposició dels investigadors que les sol·licitin les línies disponibles existents, amb els controls de qualitat necessaris per a la investigació bàsica o per al desenvolupament de l'aplicació clínica. Els bancs de CME també poden oferir suport tècnic als investigadors que en necessitin.

BASES MOLECULARS DE LA PLURIPOTÈNCIA DE LES CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES

Amb la finalitat d'entendre quines són les bases moleculars que permeten el manteniment de la pluripotència i la inducció de la diferenciació en les CME, els primers estudis es van fer en el model de ratolí. Les CME de ratolí es van aïllar l'any 1981 (Evans i Kaufman), i des de llavors, els avenços en el camp de la investigació de la biologia molecular de les CME han permès mitjançant la generació de soques transgèniques entendre el paper específic de gens responsables de *a)* el manteniment de la pluripotència en les cèl·lules de la MCI, *b)* el desenvolupament embrionari, i *c)* la diferenciació cel·lular.

En un primer moment, es van identificar *Oct4* i *Nanog* com els principals factors transcripcionals encarregats de mantenir la pluripotència i el desenvolupament de l'embrió. Per entendre millor la funció d'aquests factors en el manteniment de la pluripotència cel·lular es van fer estudis per identificar els llocs d'unió per a *Oct4* i *Sox2* en diferents regions promotores de diferents gens en CME de ratolí, i més tard en humans (revisat a Jaenisch i Young, 2008).

Sox2 es va identificar com un factor de transcripció capaç d'heterodimeritzar amb *Oct4* per regular l'expressió de diferents gens encarregats de sostenir la pluripotència de les CME (revisat a Jaenisch i Young, 2008). Igualment, es va identificar *Nanog* com l'element indispensable per al manteniment de la pluripotència en cèl·lules de la MCI en ratolí (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003). L'expressió de *Nanog* és regulada al mateix temps per *Oct4* i *Sox2* (Kuroda *et al.*, 2005). Més tard, estudis de precipitació de cromatina han demostrat que la xarxa de pluripotència *Oct4-Sox2-Nanog* comparteix un gran nombre de gens diana que codifiquen factors de transcripció imprescindibles per a la diferenciació i el desenvolupament embrionari que romanen silenciatos en CME (Boyer *et al.*, 2005; Loh *et al.*, 2006; Barrero *et al.*, 2010). Durant els últims quinze anys s'han identificat tota una sèrie de gens implicats en el manteniment de la pluripotència cel·lular, que inclouen: *Sall4*, *Dax1*, *Essrb*, *Tbx3*, *Rif1*, *Nac1* i *ZPF281*; aquests es regulen entre si i formen part d'una xarxa altament complexa que manté la pluripotència en CME (revisat per Boué *et al.*, 2010).

Independentment de les seves activitats com a factors de transcripció, les activitats proteiques d'OCT4, SOX2 i NANOG estan altament interrelacionades entre si en una xarxa complexa en què aquests elements interaccionen de manera directa. A partir d'estudis de purificació de la proteïna de NANOG en CME de ratolí, s'ha identificat una xarxa de proteïnes essencials per a la supervivència i diferenciació de les cèl·lules de la MCI. Moltes d'aquestes són al mateix temps dianes directes de *Nanog* i *Oct4*, fet que suggereix que hi ha un mecanisme d'autoregulació de la pluripotència.

La cromatina de les CME també està sotmesa a modificacions epigenètiques que

regulen la transcripció de diferents regions del genoma. Els elements reguladors del desenvolupament embrionari resten silenciatos a les CME i s'activen durant els processos de diferenciació cel·lular. Així doncs, a més de la regulació per part de factors transcripcionals sobre gens imprescindibles en el manteniment i supervivència de les CME, també hi ha mecanismes que modulen la cromatina de manera dinàmica regulant la pluripotència i diferenciació de les CME.

Els factors transcripcionals i els reguladors epigenètics són, doncs, els elements fonamentals que regulen la pluripotència cel·lular en les CME. Tant *Oct4* com *Sox2* i *Nanog* regulen gens encarregats de la remodelació de la cromatina i modificadors d'histones (revisat per Boué *et al.*, 2010; Barrero *et al.*, 2010). Al mateix temps, s'ha descrit que *Oct4*, *Sox2* i *Nanog* estan sotmesos a regulacions epigenètiques que en permeten la regulació transcripcional (Loh *et al.*, 2006).

APLICACIÓ TERAPÈUTICA DE LES CME: LIMITACIONS I ALTERNATIVES

La teràpia cel·lular amb CME consisteix en el trasplantament de cèl·lules diferenciades obtingudes a partir de CME, per tal de reparar i substituir teixits que han perdut la funcionalitat cel·lular. Hi ha, però, riscos associats amb l'ús d'aquestes cèl·lules en el context de la teràpia cel·lular i de l'enginyeria de teixits. Per definició, les CME pluripotents tenen un elevat potencial proliferatiu, que es tradueix, a vegades, en la formació de tumors després del trasplantament. Es tracta de tumors benignes, formats per estructures diferenciades, anomenats *teratomes*. Cal tenir molt en compte que hi ha l'opció que aquests tumors esde-

vinguin malignes. Diverses investigacions en les àrees de la teràpia gènica i l'oncologia han proposat estratègies per evitar el creixement descontrolat de les CME, però fins ara no han donat resultats positius. Aquest és un dels riscos principals de la utilització de les CME pluripotents en el context de la teràpia cel·lular, ja que una única cèl·lula no diferenciada entre una població de cèl·lules diferenciades trasplantades presenta el potencial de diferenciació suficient per donar lloc a la formació d'un teratoma. Una altra conseqüència derivada de la pluripotència és que una cèl·lula indiferenciada trasplantada pot diferenciar-se a l'atzar i donar lloc a un tipus cel·lular no desitjat. Per exemple, la diferenciació a os o a múscul d'una o diverses cèl·lules indiferenciades trasplantades en un cervell podria tenir conseqüències nefastes.

Hi ha també, però, alguns punts crítics a l'hora de pensar en una aplicació de les CME en teràpia cel·lular de manera immediata:

a) Els protocols de diferenciació han de millorar fins al punt en què es puguin obtenir preparacions cel·lulars homogènies prèviament diferenciades *in vitro* per evitar diferenciacions *in vivo* que podrien esdevenir teratogèniques. És imprescindible poder controlar i dirigir la diferenciació cel·lular i l'obtenció de poblacions pures per plantejar una teràpia sense risc per al pacient i amb possibilitats d'èxit.

b) És necessària una estandardització de les metodologies entre laboratoris. S'han de tenir en compte determinats aspectes tècnics: la derivació, el cultiu i els bancs de les CME s'han de dur a terme en condicions lliures d'agents xenocontaminants i complint les normes segons les bases establertes en els protocols de bones pràctiques de manipulació (GMP).

c) És imprescindible que les cèl·lules trasplantades mantinguin la seva funcionalitat.

S'han d'integrar en el teixit existent i fer les connexions necessàries per restablir la funció del teixit o òrgan.

S'ha de prevenir la reacció immunitària enfront de les CME trasplantades. S'ha descrit que les CME expressen proteïnes del multicomplex d'histocompatibilitat i que durant la diferenciació els nivells d'expressió incrementen. Així doncs, es pot pensar que després del trasplantament, les CME diferenciades podrien ser rebutjades pel sistema immunitari del receptor. Hi ha, però, alternatives per a la producció de CME humanes immunocompatibles que impliquen la reprogramació del nucli de les cèl·lules del pacient mateix a un estat pluripotent; d'aquesta manera aquestes cèl·lules reprogramades es podrien utilitzar per a trasplantament. Hi ha quatre mètodes per induir la reprogramació i la pluripotència en cèl·lules somàtiques: la transferència nuclear, la fusió de cèl·lules somàtiques amb CME, la partenogènesi i la reprogramació amb factors genètics coneguts.

MÈTODES PER INDUIR LA REPROGRAMACIÓ I LA PLURIPOTÈNCIA EN CÈL·LULES SOMÀTIQUES

La transferència nuclear somàtica

La transferència nuclear somàtica consisteix en la substitució del nucli d'un òvul per un de procedent d'una cèl·lula somàtica d'un individu adult. En l'ambient del citoplasma de l'òvul el nucli transferit és capaç de començar el procés de reprogramació, desenvolupant una cèl·lula pluripotent que posseeix la dotació genètica del donant, per evitar així el rebuig immunitari que presenten les CME. No obstant això, les dades documentades fins ara s'han ob-

tingut a partir de treballs fets amb diferents espècies animals com ara granota, conill, ratolí o ovella, entre d'altres (Briggs i King, 1952; Bromhall, 1975; Wilmut *et al.*, 1997; Gurdon i Byrne, 2003; Hochedlinger i Jaenisch, 2002), exceptuant l'espècie humana. En humans, la tècnica de la transferència nuclear produeix un elevat nombre de fracassos, ja que els nuclis de les cèl·lules adultes van acumulant mutacions en el seu DNA durant el temps i, a més, es necessiten un gran nombre de transferències per arribar a obtenir una cèl·lula somàtica pluripotent, la qual cosa fa que aquesta tècnica sigui poc eficient. A tots aquests problemes tècnics s'han d'afegir els problemes ètics que implica la utilització d'òvuls humans per a la transferència nuclear. Hi ha, però, una alternativa per al darrer cas: la *transferència nuclear somàtica alterada* (de l'anglès *altered nuclear transfer*), que consisteix a utilitzar nuclis procedents de cèl·lules somàtiques amb una mutació en el gen que codifica la proteïna Cdx2. La deficiència de Cdx2, que és una proteïna relacionada amb la formació del trofotoderma, fa que es desenvolupin pseudoembrions incapaçs d'implantar-se en l'úter, i proporciona una possible via d'obtenció de cèl·lules somàtiques que evitaria les possibles qüestions ètiques que genera la destrucció posterior d'embrions relacionada amb la transferència nuclear.

Una alternativa per no haver d'utilitzar òvuls amb la finalitat de la reprogramació nuclear és utilitzar CME per reprogramar nuclis de cèl·lules somàtiques adultes. En aquest sentit, la fusió cel·lular permet generar un híbrid de cèl·lula embrionària i cèl·lula adulta.

La fusió cel·lular

La fusió cel·lular és el fenomen biològic en què dues cèl·lules fusionen les seves membranes i donen com a resultat una única cèl·lula amb un sol nucli. Per tal d'aconseguir la fusió de les membranes, les cèl·lules s'exposen a un agent químic, com el polietilenglicol, que és un polímer que segresta l'aigua i provoca la desorganització de les membranes cel·lulars i la fusió posterior de cèl·lules.

Hi ha diferents treballs que descriuen que la fusió de CME de ratolí (Tada *et al.*, 2001) i d'humans (Cowan *et al.*, 2005) amb cèl·lules T de la sang i fibroblasts, respectivament, genera cèl·lules híbrides amb nuclis somàtics que expressen marcadors característics de CME. Cowan *et al.* (2005) van descriure que les cèl·lules obtingudes presentaven els nuclis reprogramats i en mantenien la pluripotència. Aquests estudis suggerien que les CME contenen els factors de reprogramació necessaris per poder modificar els nuclis de cèl·lules somàtiques, i això les feia cèl·lules similars a les CME.

Aquesta tècnica, tot i que presenta resultats encoratjadors, requereix algunes consideracions. En primer lloc, l'eficiència del procés de fusió entre CME i cèl·lules somàtiques és molt baixa. De la mateixa manera, es necessiten fàrmacs per seleccionar els híbrids en què la fusió s'ha fet satisfactòriament. En segon lloc, la cèl·lula híbrida presenta poliploidia (quatre nuclis), i després de la fusió coexisteixen els cromosomes de la CME amb els de la cèl·lula somàtica. Així doncs, les cèl·lules reprogramades amb aquesta tècnica presenten una dotació cromosòmica aberrant, cosa que fa que no es puguin aplicar en estudis de teràpia cel·lular, ja que idealment, hem d'obtenir cèl·lules que presentin una dotació genètica idèntica a les cèl·lules somàtiques del paci-

ent. Aquesta tècnica només seria factible si aconseguíssim eliminar els cromosomes provinents de la CME mantenint el grau de pluripotència de la cèl·lula obtinguda després de la fusió.

Partenogènesi

Hi ha un altre mètode per induir la reprogramació però que és específic de gènere, ja que només es pot aplicar al gènere femení: la partenogènesi. És el procés reproductiu mitjançant el qual l'embrió es desenvolupa a partir d'un òvul no fecundat per un espermatozoide. És una modalitat reproductiva freqüent en molts organismes, però no en mamífers. Tot i això, en moltes espècies de mamífers l'aturada en la metafase II dels oòcits per agents físics o químics (citocalasina) pot conduir al desenvolupament d'un embrió en estadi de blastòcit diploide, ja que l'agent físic/químic impedeix la divisió cel·lular però no la replicació del DNA. A partir d'aquest embrió es poden aïllar cèl·lules pluripotents que podrien ser trasplantades en les dones donants d'òvuls activats, i reduir així els problemes associats al rebuig immunitari. S'han descrit protocols per a ratolí (Kim *et al.*, 2007), macacos (Cibelli *et al.*, 2002) i humans (Revazova *et al.*, 2007).

Reprogramació somàtica mitjançant factors de transcripció coneguts

Tant la transferència nuclear com la fusió de cèl·lules somàtiques amb CME permeten la reprogramació del nucli de cèl·lules somàtiques totalment diferenciades, cosa que indica que tant els oòcits com les CME contenen els factors «reprogramadors» capaços de convertir cèl·lules somàtiques en CME. Basant-se en aquestes observa-

cions, Takashi i Yamanaka (2006) obtingueren un patró de vint-i-quatre gens, preferentment expressats en CME de ratolí, que coexpressats en fibroblasts fetals de ratolí podien induir l'estat de pluripotència i la formació de colònies amb morfologia semblant a les CME. Posteriorment, acotaren els factors realment crítics per a la inducció de la pluripotència a quatre factors transcripcionals: *Oct3/4*, *Klf4*, *Sox2* i *cMyc* (vegeu la figura 4a).

Oct3/4 és present tant en cèl·lules pluripotents com totipotents, i la seva expressió

va disminuint progressivament durant la gastrulació de l'embrió, i es manté finalment només en les cèl·lules germinals primordials.

Sox2 conté un domini d'unió a DNA de tipus HMG (de l'anglès *high motility group*), que li permet regular la transcripció d'*Oct4* i d'altres gens relacionats amb *Oct4*. La proteïna SOX2 forma heterodímers amb OCT4, la qual cosa permet regular OCT4, SOX2 i també NANOG.

Klf4 és un factor de transcripció de la família de factors semblants a Krüppel que

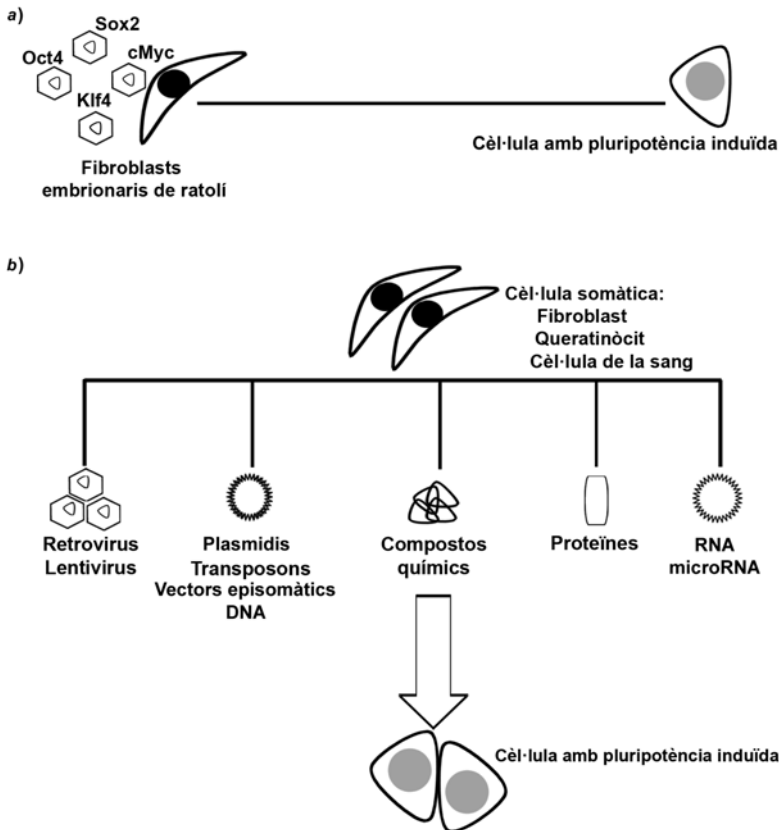


FIGURA 4. a) Reprogramació de fibroblasts embrionaris de ratolí a cèl·lules mare amb pluripotència induïda mitjançant la transducció d'*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* i *cMyc*. b) Esquema amb les diferents metodologies utilitzades en els darrers cinc anys per a la reprogramació de diferents tipus de cèl·lules somàtiques.

s'expressa en cèl·lules epitelials postmitòtiques de la pell i del tracte gastrointestinal.

cMyc és un dels primers oncogens trobats en carcinomes humans, i actua com un potent modificador de l'estructura de la cromatina mitjançant la unió a múltiples llocs del genoma (revisat per Yamanaka, 2007).

AVENÇOS EN LA INVESTIGACIÓ AMB CÈL·LULES iPS

Així doncs, Takashi i Yamanaka (2006) van descriure d'una manera senzilla com es poden aconseguir, a partir de cèl·lules somàtiques, cèl·lules mare pluripotents, altrament anomenades cèl·lules iPS (de l'anglès *induced pluripotent stem cells*). Les cèl·lules iPS esdevingueren l'eina perfecta en el context de la teràpia cel·lular, ja que, finalment, era possible aconseguir cèl·lules idèntiques a les cèl·lules dels pacients evitant els problemes relacionats amb el rebuig immunitari i amb la utilització d'embrions humans. Tot i així, la barreja de Takashi i Yamanaka requeria la utilització de dos factors oncogènics: *Klf4* i *cMyc*, i hi havia també el dubte de si aquests resultats es podrien reproduir en humans. Yu *et al.* (2007), però, van demostrar que era possible reprogramar fibroblasts humans substituint *Klf4* i *cMyc* per *Nanog* i *Lin28*. De la mateixa manera, Nakagawa *et al.* (2008) van demostrar la possibilitat de generar cèl·lules iPS a partir de fibroblasts humans i de ratolí sense incloure *cMyc*. Immediatament després, una multitud de grups van poder reproduir aquests resultats en diferents tipus cel·lulars i en diferents espècies. En l'espècie humana, s'han pogut reprogramar molts tipus cel·lulars diferents com ara queratinòcits (Aasen *et al.*, 2008), cèl·lules mare neurals (Kim *et al.*, 2009), cèl·lules mare de cordó umbilical

(Giorgetti *et al.* 2009), cèl·lules mesenquimàtiques del teixit adipós (Sun *et al.*, 2009), entre d'altres. A més a més, diferents estudis demostren que és possible reduir el nombre de factors de transcripció per tal de generar tals cèl·lules iPS.

Avui dia sabem que els factors que utilitzem per reprogramar cèl·lules somàtiques a cèl·lules iPS varien en funció del tipus cel·lular que volem reprogramar. Així doncs, se sap que cèl·lules somàtiques que expressen nivells endògens d'alguns dels quatre gens presents en els factors inicials de Takashi i Yamanaka no necessiten aquest factor per induir la pluripotència. Per exemple, Kim *et al.* (2009) van reprogramar cèl·lules mare neurals només sobreexpressant *Oct4*, ja que aquestes cèl·lules expressen de manera endògena alts nivells de *Sox2*. De la mateixa manera, Giorgetti *et al.* (2009) van reprogramar cèl·lules mare de cordó umbilical únicament mitjançant la sobreexpressió d'*Oct4* i *Sox2*, ja que aquestes cèl·lules expressen *cMyc* i altres marcadors típics de CME com *Nanog*. Fins avui dia encara es desconeix quin és el millor tipus cel·lular per convertir en iPS en el context de la teràpia cel·lular. Si tenim en compte, però, que les cèl·lules iPS s'han d'obtenir a partir de cèl·lules somàtiques de pacients, hauríem d'imaginar que el tipus cel·lular que hem de reprogramar s'ha d'obtenir de manera segura i poc invasiva. Seguint aquesta hipòtesi, Aasen *et al.* (2008) van demostrar que era possible reprogramar queratinòcits aïllats a partir d'un cabell.

La majoria de treballs des de l'any 2007 fins avui dia han utilitzat retrovirus o lentivirus per sobreexpressar de manera eficient els factors de reprogramació en els diferents tipus cel·lulars estudiats. Aquestes metodologies no són aplicables en el context de la teràpia cel·lular, ja que les iPS obtingudes s'haurien generat amb plasmidis

vírics que s'integren de manera permanent en el genoma de les cèl·lules que volem reprogramar, que promouen l'aparició de mutacions que podrien activar l'expressió d'oncogens que afavoreixin la proliferació cel·lular o la tumorigènesi.

La investigació actual se centra a desenvolupar nous mètodes per evitar aquests problemes, i de fet, treballs recents han demostrat que es poden generar cèl·lules iPS humanes amb mètodes segurs, que asseguren l'expressió transients dels factors de reprogramació, com ara plasmidis episomàtics (Yu *et al.*, 2009), adenovirus (Zhou i Freed, 2009), virus *sendai* (Fusaki *et al.*, 2009) i transposons (Woltjen *et al.*, 2009), proteïnes recombinants (Zhou *et al.*, 2009), RNA (Rossi, 2007), micro-RNA (Li *et al.*, 2011), vectors mínims d'expressió de DNA (Narsinh *et al.*, 2011), entre d'altres. Aquestes metodologies eviten la integració dels oncogens en el genoma de les cèl·lules del pacient (vegeu la figura 4b).

Tot i així, la reprogramació somàtica mitjançant factors transcripcionals coneguts té una eficiència molt baixa. De fet, només un de cada deu mil fibroblasts es reprograma de manera eficient quan sobreexpressem els factors de pluripotència mitjançant mètodes integratius com retrovirus o lentivirus. Aquesta eficiència encara disminueix més dràsticament quan volem reprogramar les cèl·lules amb metodologies no integratives. Per aquest motiu, una de les altres línies d'investigació en el camp de les iPS se centra en el descobriment de compostos químics que incrementin l'eficiència de reprogramació. Fins ara s'han descrit diferents compostos capaços d'afavorir el procés de reprogramació, com ara l'àcid valproic, el parnat o inhibidors i activadors de diferents proteïnes essencials per a la proliferació cel·lular (revisat per Desponts i Sheng Ding, 2010).

El camp de les cèl·lules iPS és molt nou, i encara desconexem els mecanismes moleculars responsables d'induir la pluripotència mitjançant factors transcripcionals coneguts en cèl·lules somàtiques. Tot i així, aquesta metodologia ofereix un escenari únic per a l'estudi de malalties monogèniques. Així doncs, hi ha hagut alguns treballs pioners que han demostrat que la correcció gènica del gen causant de la malaltia es pot efectuar en cèl·lules iPS de pacients. Una vegada aconseguit aquest procés, les cèl·lules iPS s'han diferenciat *in vitro* en el tipus cel·lular que resulta afectat per la malaltia. En concret, Raya *et al.* (2009) van demostrar que és possible reprogramar fibroblasts de pacients d'anèmia de Fanconi a cèl·lules iPS. Els autors van corregir la mutació causant de la malaltia en aquestes cèl·lules i després les van diferenciar a precursors hematopoètics, i van demostrar que era possible pensar en aquesta tecnologia en un futur no gaire llunyà en teràpies de substitució en l'àmbit de la medicina regenerativa. De la mateixa manera, la generació de cèl·lules iPS a partir de mostres de pacients de diferents malalties ha permès estudiar la progressió *in vitro* de diferents malalties (Moretti *et al.*, 2011; Itzhaki *et al.*, 2011).

Tot i així, les cèl·lules iPS encara no poden solucionar un dels principals problemes relacionats amb la utilització de les CME en estudis *in vivo*. Recentment, un estudi comparatiu ha descrit que una vegada injectades en els ratolins immunodeprimits, les cèl·lules iPS de ratolí són més tumorigèniques que les CME de ratolí (Miura *et al.*, 2009). Altres observacions més recents han demostrat que el procés de la reprogramació nuclear mitjançant factors transcripcionals coneguts presenta similituds amb els mecanismes relacionats amb la transformació cel·lular durant processos tumorigènics (revisat per Boué *et al.*, 2010).

Aquestes observacions limiten la utilització immediata de les cèl·lules iPS per a estudis de teràpia gènica en humans.

Tot i que l'aplicació clínica de les cèl·lules iPS encara presenta limitacions relacionades amb el seu potencial tumorigènic, aquesta tecnologia es presenta com a eina fonamental per a la investigació de les bases moleculars responsables de l'adquisició i manteniment de la pluripotència cel·lular, així com dels processos de diferenciació cel·lular. De la mateixa manera, aquesta metodologia esdevé fonamental per a l'estudi de malalties degeneratives, i un context únic per a l'assaig de drogues i fàrmacs específics per a cada pacient.

Així doncs, en el capítol present hem resumit els avenços científics de les últimes tres dècades en el camp de la biologia de les cèl·lules mare embrionàries humanes. També hem explicat com els inconvenients relacionats amb l'ús d'aquestes cèl·lules han conduït envers el desenvolupament de diferents alternatives, com ara les cèl·lules iPS. Tot i que aquestes encara estan en el seu naixement, representen un descobriment únic en el camp de la medicina regenerativa i del modelatge *in vitro* de malalties degeneratives.

AGRAÏMENTS

Volem agrair a tots els membres del laboratori de Juan Carlos Izpisúa Belmonte, del Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMR[B]), pels seus comentaris i suggerències, però molt especialment a Laia Miquel, per la revisió, correcció i modificacions del capítol, i a Mercè Martí per la seva ajuda en la detecció de marcadors de pluripotència en CME i l'adquisició de les imatges de les immunofluorescències presentades en el capítol.

Finalment, volem agrair, de manera molt especial, Anna Veiga, responsable del Banc de Línies Cel·lulars del CMR[B], per tots els suggeriments i comentaris, així com per la seva feina divulgativa al llarg de tots aquests anys. Ella és un referent a escala mundial en el camp de les CME.

BIBLIOGRAFIA

- AASEN, T.; RAYA, A.; BARRERO, M. J.; GARRETA, E.; CONSIGLIO, A.; GONZALEZ, F.; VASSENA, R.; BILIC, J.; PEKARIK, V.; TISCORNIA, G.; EDEL, M.; BOUÉ, S.; IZPISÚA BELMONTE, J. C. (2008). «Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes». *Nat. Biotechnol.*, 26: 1276-1284.
- ARAN, B.; RODRÍGUEZ-PIZÀ, I.; RAYA, A.; CONSIGLIO, A.; MUÑOZ, Y.; BARRI, P. N.; IZPISÚA, J. C.; VEIGA, A. (2010). «Derivation of human embryonic stem cells at the Center of Regenerative Medicine in Barcelona». *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 46: 356-366.
- BARRERO, M. J.; BOUÉ, S.; IZPISÚA-BELMONTE, J. C. (2010). «Epigenetic mechanisms that regulate cell identity». *Cell Stem Cell*, 7: 565-570.
- BORSTLAP, J.; STACEY, G.; KURTZ, A.; ELSTNER, A.; DAMASCHUN, A.; ARÁN, B.; VEIGA, A. (2008). «First evaluation of the European hESCreg». *Nature Biotech.*, 26: 859-860.
- BOUÉ, S.; PARAMONOV, I.; BARRERO, M. J.; IZPISÚA-BELMONTE, J. C. (2010). «Analysis of human and mouse reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem cells. What is in the plate?». *PloS One*, 5: pii:e12664.
- BOYER, L. A.; LEE, T. I.; COLE, M. F.; JOHNSTONE, S. E.; LEVINE, S. S.; ZUCKER, J. P.; GUENTER, M. G.; KUMAR, R. M.; MURRAY, H. L.; JENNER, R. G.; GIFFORD, D. K.; MELTON, D. A.; JAENISCH, R.; YOUNG, R. A. (2005). «Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells». *Cell*, 122: 947-956.
- BRIGGS, R.; KING, T. J. (1952). «Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 38: 455-463.
- BROMHALL, J. D. (1975). «Nuclear transplantation in the rabbit egg». *Nature*, 258: 719-722.
- BUZZARD, J. J.; GOUGH, N. M.; CROOK, J. M.; COLMAN, A. (2004). «Karyotype of human ES cells during extended culture». *Nat. Biotechnol.*, 22: 381-382.

- CAISANDER, G.; PARK, H.; FREI, K.; LINDQVIST, J.; BERGH, C.; LUNDIN, K.; HANSON, C. (2006). «Chromosomal integrity maintained in five human embryonic stem cell lines after prolonged in vitro culture». *Chromosome Res.*, 14: 131-137.
- CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M.; NICHOLS, J. LEE, S.; TWEEDIE, S.; SMITH, A. (2003). «Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells». *Cell*, 113: 643-655.
- CHEN, A.; EGLI, D.; NIAKAN, K.; DENG, J.; AKUTSU, H.; YAMAKI, M.; COWAN, C.; FITZ-GERALD, C.; ZHANG, K.; MELTON, D. A.; EGGAN, K. (2009). «Optimal timing of inner cell mass isolation increases the efficiency of human embryonic stem cell derivation and allows generation of sibling cell lines». *Cell Stem Cell*, 4: 103-106.
- CIBELLI, J. B.; GRANT, K. A.; CHAPMAN, K. B.; CUNNIFF, K.; WORST, T.; GREEN, H. L.; WALKER, S. J.; GUTIN, P. H.; VILNER, L.; TABAR, V.; DOMINKO, T.; KANE, J.; WETTSTEIN, P. J.; LANZA, R. P.; STUDER, L.; VRANA, K. E.; WEST, M. D. (2002). «Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates». *Science*, 295: 819.
- COWAN, C. A.; ATIENZA, J.; MELTON, D. A.; EGGAN, K. (2005). «Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells». *Science*, 309: 1369-1373.
- COWAN, C. A.; KLIMANSKAYA, I.; MCMAHON, J.; ATIENZA, J.; WITMYER, J.; ZUCKER, J. P.; WANG, S.; MORTON, C. C.; MCMAHON, A. P.; POWERS, D.; MELTON, D. A. (2004). «Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts». *N. Engl. J. Med.*, 350: 1353-1356.
- DESPOPTS, C.; DING, S. (2010). «Using dmsl molecules to improve generation of induced pluripotent stem cells from somatic cells». *Methods Mol. Biol.*, 636: 207-218.
- DRAPER, J. S.; SMITH, K.; GOKHALE, H. D.; MALTBY, E.; JOHNSON, J.; MEISNER, L.; ZWAKA, T. P.; THOMSON, J. A.; ANDREWS, P. W. (2004). «Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells». *Nat. Biotechnol.*, 22: 53-54.
- ELLESTRÖM, C.; STREHL, R.; MOYA, K.; ANDERSSON, K.; BERGH, C.; LUNDIN, K.; HYLLNER, J.; SEMB, H. (2006). «Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line». *Stem Cells*, 24: 2170-2176.
- EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. (1981). «Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos». *Nature*, 292: 154-156.
- FUSAKI, N.; BAN, H.; NISHIYAMA, A.; SAEKI, K.; HASEGAWA, M. (2009). «Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome». *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.*, 85: 348-362.
- GIORGETTI, A.; MONTSERRAT, N.; AASEN, T.; GONZALEZ, F.; ROGRÍGUEZ-PIZÀ, I.; VASSENA, R.; RAYA, A.; BOUÉ, S.; BARRERO, M. J.; CORBELLA, B. A.; TORRABADELLA, M.; VEIGA, A.; IZPISÚA BELMONTE, J. C. (2009). «Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2». *Cell Stem Cell*, 5: 353-357.
- GURDON, J. B.; BYRNE, J. A. (2003). «The first half-century of nuclear transplantation». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100: 8048-8052.
- HASEGAWA, K.; POMEROY, J. E.; PERA, M. F. (2010). «Current technology for the derivation of pluripotent stem cell lines from human embryos». *Stem Cells*, 6: 521-531.
- HEINS, N.; ENGLUND, M. C.; SJOBLUM, C.; DAHL, U.; TONING, A.; BERGH, C.; LINDAHL, A.; HANSON, C.; SEMB, H. (2004). «Derivation, characterization, and differentiation of human embryonic stem cells». *Stem Cells*, 22: 367-376.
- HOCHEDLINGER, K.; JAENISCH, R. (2002). «Nuclear transplantation: lessons from frogs and mice». *Curr. Opin. Cell Biol.*, 14: 741-748.
- ITZHAKI, I.; MAIZELS, L.; HUBER, I.; ZWI-DANTSIS, L.; CASPI, O.; WINTERSTEM, A.; FELDMAN, O.; GEPSTEIN, A.; ARBEL, G.; HAMMERMAN, H.; BOULOS, M.; GEPSTEIN, L. (2011). «Modelling the long QT syndrome with induced pluripotent stem cells». *Nature*. [En premsa]
- JAENISCH, R.; YOUNG, R. (2008). «Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming». *Cell*, 132: 567-582.
- KIM, J. B.; ZAEHRES, H.; ARAÚZO-BRAVO, M. J.; SCHÖLER, H. R. (2009). «Generation of induced pluripotent stem cells from neural stem cells». *Nat. Protoc.*, 4: 1464-1470.
- KIM, K.; LEROU, P.; YABUCHI, A.; LINGERKE, C.; NG, K.; WEST, J.; KIRBY, A.; DALY, M. J.; DALEY, G. Q. (2007). «Histocompatible embryonic stem cells by parthenogenesis». *Science*, 315: 482-486.
- KLIMANSKAYA, I.; CHUNG, Y.; BECKER, S.; LU, S. J.; LANZA, R. (2006). «Human embryonic stem cells derived from single blastomeres». *Nature*, 444: 481-485.
- KLIMANSKAYA, I.; CHUNG, Y.; MEISNER, L.; JOHNSON, J.; WEST, M. D.; LANZA, R. (2005). «Human embryonic stem cells derived without feeder cells». *Lancet*, 365: 1636-1641.
- KURODA, T.; TADA, M.; KUBOTA, H.; KIMURA, H.; HATANO, S. Y.; SUEMORI, H.; TADA, T. (2005). «Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression». *Mol. Cell Biol.*, 25: 2475-2485.

- LEI, T.; JACOB, S.; AJIL-ZARAA, I.; DUBUISSON, J. B.; IRION, O.; JACONI, M.; FEKI, A. (2007). «Xeno-free derivation and culture of human embryonic stem cells: current status, problems and challenges». *Cell Research*, 17: 682-688.
- LEROU, P.; YABUUCHI, A.; HUO, H.; TAKEUCHI, A.; SHEA, J.; CIMINI, T.; INCE, T.; GINBURG, E.; RACOWSKY, C.; DALEY, G. (2008). «Human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos». *Nature Biotech.*, 26: 212-214.
- LI, Z.; YANG, C. S.; NAKASHIMA, K.; RANA, T. M. (2011). «Small RNA-mediated regulation of iPSC cell generation». *EMBO J.* [En premsa]
- LOH, Y. H.; WU, Q.; CHEW, J. L.; VEGA, V. B.; ZHANG, W.; CHEN, X.; BOURQUE, G.; GEORGE, J.; LEONG, B.; LIU, J.; WRONG, K. Y.; SUNG, K. W.; LEE, C. W.; ZHAO, X. D.; CHIU, K. P.; LIPOVICH, L.; KUZNETSOV, V. A.; ROBSON, P.; STANTON, L. W.; WEI, C. L.; RUAN, Y.; LIM, B.; NG, H. H. (2006). «The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells». *Nat. Genet.*, 38: 431-440.
- LÖSER, P.; SCHIM, J.; GUHR, A.; WOBUS, A. M.; KURTZ, A. (2010). «Human embryonic stem cell lines and their use in international research». *Stem Cells*, 28: 240-246.
- MITALIPOVA, M.; CALHOUN, J.; SHIN, S.; WININGER, D.; SCHULZ, T.; NOGGLE, S.; VENABLE, A.; LYONS, I.; ROBINS, A.; STICE, S. (2003). «Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos». *Stem Cells*, 21: 521-526.
- MITSUI, K.; TOKUZAWA, Y.; ITOH, H.; SEGAWA, K.; MURAKAMI, M.; TAKAHASHI, K.; MATUYAMA, M.; MAEDA, M.; YAMANAKA, S. (2003). «The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells». *Cell*, 113: 631-642.
- MIURA, K.; OKADA, Y.; AOI, T.; OKADA, A.; OKITA, K.; NAKAGAWA, M.; KOYANAGI, M.; TANABE, K.; OHNUKI, M.; OGAWA, D.; IKEDA, E.; OKANO, H.; YAMANAKA, S. (2009). «Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines». *Nat Biotechnol.*, 27: 743-745.
- MORETTI, A.; BELLIN, M.; WELLING, A.; JUNG, C. B.; LAM, J. T.; BOTT-FLÜGEL, L.; DORN, T.; GOEDEL, A.; HÖHNKE, C.; HOFMANN, F.; SEYFARTH, M.; SINNECKER, D.; SCHÖMING, A.; LAUGWITZ, K. L. (2011). «Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome». *N. Engl. Med.*, 364: 181-182.
- NAKAGAWA, M.; KOYANAGI, M.; TANABE, K.; TAKAHASHI, K.; ICHISAKA, T.; OKITA, K.; MOCHIDUKI, Y.; TAKIZAWA, N.; YAMANAKA, S. (2008). «Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts». *Nat. Biotechnol.*, 26: 101-106.
- NARSINH, K. H.; JIA, F.; ROBBINS, R. C.; KAY, M. A.; LONGAKER, M. T.; WU, J. C. (2011). «Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors». *Nat. Protoc.*, 6: 78-88.
- RAYA, A.; RODRÍGUEZ-PIZÀ, I.; ARAN, B.; CONSIGLIO, A.; BARRI, P. N.; VEIGA, A.; IZPISÚA, J. (2008). «Generation of cardiomyocytes from new human embryonic stem cells derived from poor-quality blastocysts». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 73: 127-135.
- RAYA, A.; RODRÍGUEZ-PIZÀ, I.; GUENECHEA, G.; VASSENA, R.; NAVARRO, S.; BARRERO, M. J.; CONSIGLIO, A.; CASTELLÀ, M.; RÍO, P.; SLEEP, E.; GONZÁLEZ, F.; TISCORNIA, G.; GARRETA, E.; AASEN, T.; VEIGA, A.; VERMA, I. M.; SURRALLÉS, J.; BUEREN, J.; IZPISÚA BELMONTE J. C. (2009). «Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells». *Nature*, 460: 53-59.
- REVAZOVA, E. S.; TUROVETS, N. A.; KOCHETKOVA, O. D.; KINDAROVA, L. B.; KUZMICHEV, L. N.; JANUS, J. D.; PRYZHKOVA, M. V. (2007). «Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts cloning and stem cells». *Cloning Stem Cells*, 9: 432-449.
- ROSSI, J. J. (2007). «Transcriptional activation by small RNA duplexes». *Nat. Chem. Biol.*, 3: 136-137.
- SJÖGREN, A.; HARDARSON, T.; ANDERSON, K.; CAISANDER, G.; LUNDQUIST, M.; WIKLAND, M.; SEMB, H.; HAMBERGER, L. (2004). «Human blastocysts for the development of embryonic stem cells». *Reprod. Biomed. Online*, 9: 326-329.
- SPTS, C.; MATEIZEL, I.; GEENS, M.; MERTZANIDOU, A.; STAESSEN, C.; VANDESSELDE, Y.; ELST, J. VAN DER; LIEBAERS, I.; SERMON, K. (2008). «Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells». *Nat. Biotechnol.*, 26: 1361-1363.
- STRELCHENKO, N.; VERLINSKY, O.; KUKHARENKO, V.; VERLINSKY, Y. (2004). «Morula-derived human embryonic stem cells». *Reprod. Biomed. Online*, 9: 623-629.
- STRÖM, S.; INZUNZA, J.; GRINNEBO, K. H.; HOLMERG, K.; MATILAINEN, E.; STRÖMBERG, A. M.; BLENNOW, E.; HOVATTA, O. (2007). «Mechanical isolation of the inner cell mass is effective in derivation of new human embryonic stem cell lines». *Hum. Reprod.*, 22: 3051-3058.
- SUN, N.; PANETTA, N. J.; GUPTA, D. M.; WILSON, K. D.; LEE, A.; JIA, F.; HU, S.; CHERRY, A. M.; ROBBINS, R. C.; LONGAKER, M. T.; WU, J. C. (2009). «Feeder-free derivation of induced pluripotent

- stem cells from adult human adipose stem cells». *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106: 15720-15725.
- TADA, M.; TAKAHAMA, Y.; ABE, K.; NAKATSUJI, N.; TADA, T. (2001). «Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells». *Curr. Biol.*, 11: 1553-1558.
- TAKAHASHI, K.; YAMANAKA, S. (2006). «Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblasts cultures by defined factors». *Cell*, 126: 652-655.
- TANAKA, N.; TAKEUCHI, T.; NERI, Q.; SILLS, E. S.; PALERMO, G. D. (2006). «Laser-assisted blastocysts dissection and subsequent cultivation of embryonic stem cells in a serum/cell free culture system: applications and preliminary results in a murine model». *J. Trans. Med.*, 4: 20.
- THOMSON, J. A.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S. S.; WAKNITZ, M. A.; SWIERGIEL, J. J.; MARSHALL, V. S.; JONES, J. M. (1998). «Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts». *Science*, 282: 1145-1147.
- TURETSKY, T.; AIZENMAN, E.; GIL, Y.; WEINBERG, N.; SHUFARO, Y.; REVEL, A.; LAUFER, N.; SIMON, A.; ABELIOVICH, D.; REUBINOFF, B. E. (2008). «Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis». *Hum. Reprod.*, 23: 46-53.
- WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; McWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. (1997). «Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells». *Nature*, 385: 810-813.
- WOLTJEN, K.; MICHAEL, I. P.; MOHSENI, P.; DESAI, R.; MILEIKOVSKY, M.; HÄMÄLÄINEN, R.; COWLING, R.; WANG, W.; LIU, P.; GERTSENSTEIN, M.; KAJI, K.; SUNG, H. K.; NAGY, A. (2009). «Piggyback transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells». *Nature*, 458: 766-770.
- YAMANAKA, S. (2007). «Strategies and new developments in the generation of patients-specific pluripotent stem cells». *Cell Stem Cell*, 1: 39-49.
- YU, J.; HU, K.; SMUGA-OTTO, K.; TIAN, S.; STEWART, R.; SLUKVIN, I. I.; THOMSON, J. A. (2009). «Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences». *Science*, 324: 797-801.
- YU, J.; VODYANIK, M. A.; SMUGA-OTTO, K.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; FRANE, J. L.; TIAN, S.; NIE, J.; JONSDOTTI, G. A.; RUOTTI, V.; SLUKVIN, I. I.; THOMSON, J. A. (2007). «Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells». *Science*, 318: 1917-1920.
- ZHANG, X.; STOJKOVIC, P.; PRZYBORSKI, S.; COOKE, M.; ARMSTRONG, L.; LAKO, M.; STOJKOVIC, M. (2006). «Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos». *Stem Cells*, 24: 2669-2676.
- ZHOU, H.; WU, S.; JOO, J. Y.; ZHU, S.; HAN, D. W.; LIN, T.; TRAUGER, S.; BIEN, G.; YAO, S.; ZHU, Y.; SIUZDAK, G.; SCHÖLER, H. R.; DUAN, L.; DING, S. (2009). «Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins». *Cell Stem Cell*, 4: 381-384.
- ZHOU, W.; FREED, C. R. (2009). «Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells». *Stem Cells*, 27: 2667-2674.

SOBRE ELS AUTORS

Juan Carlos Izpisúa i Belmonte (Hellín, 1960). Es va llicenciar en farmacologia i va fer la seva tesi doctoral en bioquímica i farmacologia entre les universitats de València i Bolonya (Itàlia). Actualment és el director científic del Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMR[B]) i professor en el Salk Institute (La Jolla, Califòrnia). El seu objectiu és investigar els mecanismes moleculars que regulen la pluripotència i la diferenciació cel·lular. Amb aquesta finalitat, utilitza models *in vitro* basats en les cèl·lules mare embrionàries de ratolí i d'humà. Com a models experimentals *in vivo* utilitza embrions de diferents espècies (ratolí, peix zebra, grana). Aquestes aproximacions permeten entendre els mecanismes moleculars que regulen la formació d'òrgans i teixits i aprofundir-hi. En els últims deu anys el seu grup d'investigació ha fet un gran nombre de contribucions significatives en el camp de les cèl·lules mare embrionàries i les cèl·lules mare de pluripotència induïda.

Núria Montserrat i Pulido (Barcelona, 1978). Es va llicenciar en biologia a la Universitat de Barcelona (2001). Hi va fer el seu màster experimental en biologia (2002, Universitat de Barcelona). Posteriorment, durant la seva tesi doctoral (2006, Universitat de Barcelona), els estudis es van centrar

a aïllar i caracteritzar cèl·lules mare musculars en diferents models animals. Actualment és investigadora postdoctoral en el Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMR[B]) sota la direcció de Juan Carlos Izpisua Belmonte. El seu objectiu en els últims anys de carrera científica ha estat entendre els mecanismes moleculars que regulen la pluripotència i diferenciació en les cèl·lules mare embrionàries. Al mateix temps, la seva investigació trasllada aquests coneixements per a la generació de cèl·lules mare amb pluripotència induïda a partir de diferents tipus cel·lulars i en diferents espècies.

Begoña Aran i Corbella (Vitoria-Gasteiz, 1963). Va estudiar la seva llicenciatura a Barcelona (Universitat Autònoma de Barcelona), on va fer la seva tesi doctoral. Ha estat la coordinadora del banc de línies cel·lulars de Barcelona en el CMR[B] i anteriorment embrióloga del laboratori de fecundació *in vitro* de l'Institut Universitari Dexeus. Experta en cultiu i desenvolupament d'embrions, així com en tècniques de micromanipulació com la microinjecció intracitoplasmàtica i la biòpsia embrionària. En els últims anys s'ha dedicat a la derivació i cultiu de línies de cèl·lules mare embrionàries humanes.