



TESI DOCTORAL UPF / 2010



Development of xenobiotic-free conditions towards the generation and propagation of clinically-safe human pluripotent stem cells

Ignasi Rodríguez Pizà

TESI DOCTORAL UPF / 2010

Development of xenobiotic-free conditions towards the generation and propagation of clinically-safe human pluripotent stem cells.

Desenvolupament de condicions lliures de xenobiòtics per a la generació i propagació de cèl·lules pluripotents humanes per aplicació clínica

Ignasi Rodríguez Pizà

Ignasi
Rodríguez
Pizà

Development of xenobiotic-free conditions towards the generation
and propagation of clinically-safe human pluripotent stem cells

Tesi doctoral UPF 2010

Thesis directed by:

Professor Anna Veiga Lluçh
Professor Àngel Raya Chamorro
Professor Juan Carlos Izpisúa Belmonte

CMR[B]^R



A Jaime y aToñi, mis padres.

ACKNOWLEDGEMENTS
AGRAÏMENTS

En primer lugar quiero agradecer a mis directores de tesis Anna, Ángel y Juan Carlos por todo el apoyo que me han dado durante estos años. A Anna además por haber sido una excelente mentora en lo personal y laboral así como una gran amiga. Y a Ángel por haberme enseñado más de lo que creía que podría llegar a aprender y por haber sido un muy buen compañero.

También les estoy muy agradecido a mis compañeras y amigas del Banco de Líneas Celulares. A Bego, mi compañera codo con codo en el día a día. A Yoli que tanto me ha ayudado en todos mis proyectos. A Rita por ser una gran amiga y una profesora de inglés insuperable. A Alessandra por confiar en mí para sus proyectos y por darle color a nuestra vida. Y a Anuska porque sin ella todo hubiera sido mucho más difícil.

A mi gran amiga Meritxell por inyectar alegría y buen ambiente en el día a día del laboratorio y por haberme enseñado tanto en el campo del cultivo celular. A Yvonne, mi compañera de fatigas inseparable y la persona más generosa que yo he conocido.

A Mercè por combinar su inmensa profesionalidad con una cercanía y amabilidad que hacen que todo sea muy fácil. A Lola, Esther, Cristina P y Cristina M que en su pequeño oasis nos han ahorrado tanto trabajo y tan bien hecho. A Vaquero, nuestro mejor capitán, porque su carácter nos inspira a todos.

A Eduard. ¿Cómo se puede dar tanta guerra y ser tan buena persona a la vez? A Adriana, Erika, Alex, Borja, Cristina y Raquel, mis iguales en el arduo camino del doctorado.

A Fede, Gustavo, Sergio, Trond y María José por sus discusiones y consejos que han hecho de mi tesis un trabajo mejor. A Montse, Laura y Vane que me han ayudado siempre que las he necesitado.

A Vlad, Josipa, Antonio, Cristina E, Susana, Aida, Elena, Julio, Alba, Nuria, Bea, Chris, Marina, Joaquín, Carme, Cristina G, Vanesa R, Laetitia, Manuel, Stephanie, Toni V, Pere S, Jose Manuel, Leopoldo, Antonella, Ina, Ida, Miguel, Susy, Mike, Lorena, Carles, Marc, María V, Anna G, Rosabel, Yara, Ania, Toni M, Gloria y Miquel Gómez, la gran familia que ha sido para mí todo el personal del CMR[B], que me ha hecho sentir una persona querida y respetada.

A Juan Ignacio Jorquera y a Montserrat Costa de Instituto Grifols S.A. por su ayuda incondicional en nuestra colaboración.

A Carlos e Isidro por ser los mejores compañeros de viaje que uno podría encontrar y por su comprensión en los momentos difíciles.

A mis padres por apoyarme en todas y cada una de mis decisiones personales y laborales de forma incondicional y por haberme educado en los valores correctos de la vida. A mis hermanos, Jaime, Álvaro y Carlos, y a Noemí por ser todo lo que uno esperaría de una familia unida.

A mis otros hermanos Elena, Francisco, Guida, Itziar, Mari y Toni porque no entiendo mi vida sin ellos. También a mis amigos Josep P, Marta V, Ignacio B, Dani T, Marina, Amélia, David S, Guillem, Judit, M^{re} Paz, Sandra, Patri, Carles, Albert, Elena M, Jordi I, Dani P, Miquel F, Emma, Elisenda, Bet, Quim, Joan T, Roger y especialmente a Oriol por ser mi primer mentor y mi ejemplo a seguir.

En memoria de David Mercadal porque no hay día que no piense en él.

List of contents

Índex

01. Abstract	
01. Resum	pag 06
02. List of abbreviations	
02. Llista d'abreviatures	pag 08
03. Introduction	pag 10
3.1 GENERAL INTRODUCTION	pag 11
3.2 CELL POTENCY	pag 11
3.2.1 Totipotent cells	
3.2.2 Pluripotent cells	
3.2.3 Multipotent cells	
3.3 EMBRYONIC STEM CELLS	pag 14
3.3.1 Biomedical Importance of hESC	
3.3.2 hESC Derivation	
3.3.3 Culture methods	
3.3.4 hESC characterization	
3.4 INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS	pag 26
3.4.1 Similarities and differences between ESC and iPSC	
3.4.2 hiPSC as disease models	
3.5 CLINICAL TRANSLATION OF PLURIPOTENT CELL BASED THERAPIES	pag 31
3.5.1 Establishing differentiation protocols	
3.5.2 Immunologic rejection	
3.5.3 Tumorigenic risk	
3.5.4 Clinical grade cell production and culture conditions	

03. Introducció	pag 36
3.1 INTRODUCCIÓ GENERAL	pag 37
3.2 TIPUS DE POTENCIALITAT CEL·LULAR	pag 37
3.2.1 Cèl·lules totipotents	
3.2.2 Cèl·lules pluripotents	
3.2.3 Cèl·lules multipotents	
3.3 CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES	pag 41
3.3.1 Importància biomèdica de les hESC	
3.3.2 Derivació	
3.3.3 Mètodes de cultiu	
3.3.4 Caracterització	
3.4 CÈL·LULES MARE DE PLURIPOTÈNCIA INDUÏDA	pag 56
3.4.1 Similituds i diferències entre les ESC i les iPSC	
3.4.2 Les hiPSC com a model de malalties	
3.5 TRANSLACIÓ CLÍNICA DE LES TERÀPIES AMB CÈL·LULES PLURIPOTENTS	pag 61
3.5.1 Establiment de protocols de diferenciació	
3.5.2 Rebuig immunitari	
3.5.3 Risc tumoral	
3.5.4 Condicions de producció i cultiu de grau clínic	

04.	Objectives		
04.	Objectius		pag 66
05.	Results		
05.	Resultats		pag 68
	PAPER 1		
	Generation of cardiomyocytes from new human embryonic stem cell lines derived from poor-quality blastocysts		pag 70
	PAPER 2		
	Derivation oh human embryonic stem cells at the Center of Regenerative Medicine in Barcelona		pag 82
	PAPER 3		
	Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells.....		pag 96
	PAPER 4		
	A protocol describing the genetic correction of somatic human cells and subsequent generation of iPS cells.....		pag 108
	PAPER 5		
	Reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions		pag 124
	PAPER 6		
	Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2		pag 136
	PAPER 7		
	Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood cells with only two factors: Oct4 and Sox2		pag 144
	PAPER 8		
	Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector		pag 156

06. Discussion pag **164**

6.1 CLINICAL TRANSLATION OF hESC

6.2 CLINICAL TRANSLATION OF hiPSC

6.3 FUTURE GOALS

06. Discussió pag **170**

6.1 TRANSLACIÓ CLÍNICA DE LES HESC

6.2 TRANSLACIÓ CLÍNICA DE LES HIPSC

6.3 REPTES PER AL FUTUR

07. Conclusions

07. Conclusions pag **178**

08. References

08. Bibliografia pag **180**

01.

ABSTRACT
RESUM

ABSTRACT

Human embryonic stem cells (hESC) and, more recently, induced pluripotent cells (iPSC) represent a new and unprecedented opportunity for the development of new therapeutic strategies for human degenerative diseases. The possibility to derive patient specific iPSC opens the door to the establishment of disease models exquisitely human. One of the limitation that, concretely, limits the clinic application of pluripotent cells is the fact that their derivation, currently, is obtained with media and reagents which contain animal proteic sources (xenobiotics). This thesis contributes to the development of protocols of derivation and culture of hESC that bring them closed to a clinical application. Moreover, we have developed iPSC-based strategies that are both safer and more effective for the treatment of human diseases.

RESUM

Les cèl·lules mare embrionàries humanes (hESC) i més recentment les cèl·lules de pluripotència induïda (iPSC) representen una oportunitat sense precedents per al desenvolupament de noves estratègies terapèutiques per malalties degeneratives humanes. Així mateix, la possibilitat d'obtenir iPSC específiques de pacient obre la porta per l'establiment de models de malaltia genuïnament humans. Una de les limitacions que dificulta l'aplicació clínica de les cèl·lules pluripotents és que la seva obtenció es du a terme a l'actualitat amb medis i reactius que contenen fonts proteiques d'origen animal (xenobiòtics). Aquesta tesi contribueix al desenvolupament de protocols de derivació i de cultiu de hESC, que les apropa a la seva utilització clínica. A més hem desenvolupat estratègies basades en iPSC més segures i eficaces per al tractament de malalties humanes.

02.

LIST OF ABBREVIATIONS
LLISTA D'ABREVIATURES

LIST OF ABBREVIATIONS / LLISTA D'ABREVIATURES

AP	Alkaline phosphatase
ASC	Adult stem cells
bFGF	Basic fibroblast growth factor
EB	Embryoid bodies
ESC	Embryonic stem cells
FA	Fanconi's Anemia
FBS	Fetal bovine serum
IVF	<i>In vitro</i> fecundation
FL	Flt3 ligand
GMP	Good manufacturing practice
hESC	Human embryonic stem cells
HFF	Human foreskin fibroblasts
hiPSC	Human induced pluripotent stem cells
HLA	Human leukocyte antigen
HSC	Hematopoietic stem cells
ICM	Inner cell mass
iPSC	Pluripotent stem cells
ISSCR	International Society for Stem Cell Research
KO-SR	Knockout Serum Replacement
LIF	Leukemia inhibitory factor
MEF	Mouse embryonic fibroblasts
mESC	Mouse embryonic fibroblasts
miPSC	Mouse induced pluripotent stem cells
MSC	Mesenchymal stem cells
PGC	Primordial stem cells
PGD	Preimplantation genetic diagnosis
SCF	Stem cell factor
SCID	Severe combined immuno-deficient
SSC	Spermatogonial stem cells
SSEA	Stage specific embryonic antigen
TRA	Tumor related antigen
ZP	Zona pellucida

03.

INTRODUCTION

3.1 GENERAL INTRODUCTION

With the union of the spermatozoon with an oocyte begins the process that will bring a single cell to develop into a complex and unique organism. The cell product of this fusion is called zygote, and is the essence of what we define as totipotent cell. The zygote has the ability to give rise to any cell type in the organism and not only this, but also it has the ability to direct the organization of these cell populations into functioning tissues, the tissues in organs, and the organs into an individual, as long as it remains into an adequate environment such as, for placental animals, the maternal uterus.

The zygote is endowed with the full genetic and epigenetic information necessary to bring the process of embryonic development to full fruition. The genetic information in the zygote is the result of the sum of the genetic material of both the maternal and the paternal gametes. However, it is not only the information carried by the genes of the gametes that allows for a correct development of the zygote, but also the active or inactive status of all the genes in its own genome (what it is known as epigenetic state), which allows for a correct expression of the genes and a correct development of the embryo.

Once the fertilization has taken place, the zygote starts a process of cell division that, in a period of 3 days, makes it arrive to the stage of 8 cells (called blastomeres) in the human species. From this point on, the process of compaction starts, and the borders between cells become undistinguishable, and for the first time it will be possible to distinguish two cell populations in the embryo. On one hand, the cells that are on the exterior of the embryo will establish very tight cell junctions and are destined to form the trophectoderm, from which the embryonic contribution to the placenta is derived. The cells that remain on the inside of the embryo maintain looser contact with each other, and this allows for cell reorganization, and will give rise to the inner cell mass (ICM). The cells of the ICM are responsible for forming all the cell types that will form the fetus.

3.2 CELL POTENCY

3.2.1 TOTIPOTENT CELLS

These are the cells that form an embryo from fertilization to the 8 cell stage, before compaction. These cells have the ability to form any cell type of the fetus as well as of the extra embryonic membranes. The totipotent ability of these cells is shown by the fact that each blastomere of the embryo at these stages has the ability to form a new complete individual if separated (Moore et al., 1968; Rossant, 1976; Tarkowski and Wroblewska, 1967). As a matter of fact, this exact method has been used for reproductive cloning in animal research and production.

3.2.2 PLURIPOTENT CELLS

These are those cells that have the capacity to form any cell type of an adult organism. There are 5 kinds of pluripotent cells:

3.2.2.1 Cells of the inner cell mass

These cells are located inside the blastocoel of embryos at 5-7 days of development in the case of the

human species. During development, these cells differentiate into, on one side, the primitive endoderm, which in turn will give rise to the extra embryonic structures, and on the other hand to the epiblast, which will give rise to the three original germ layers of the embryo: endoderm, mesoderm and ectoderm. From these three tissues will originate all other tissues in the entire organism.

3.2.2.2 Embryonic stem cells

Are the cells that can be derived from a pre-embryo and can be maintained indefinitely in culture *in vitro* (figure 1). Embryonic stem cells (ESC) retain the pluripotent ability of the inner cell mass (ICM) cells, and, as a main characteristic, acquire the ability to self renew in adherent culture. These cells have been described for the first time in mice in 1981 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981), but it was not until the 1998 that the first human ESC (hESC) line has been derived (Thomson et al., 1998). These cells are obtained mainly from the blastocyst but they can be derived also from the morula stage embryo or from a single blastomere. (Expanded in session 3.3).

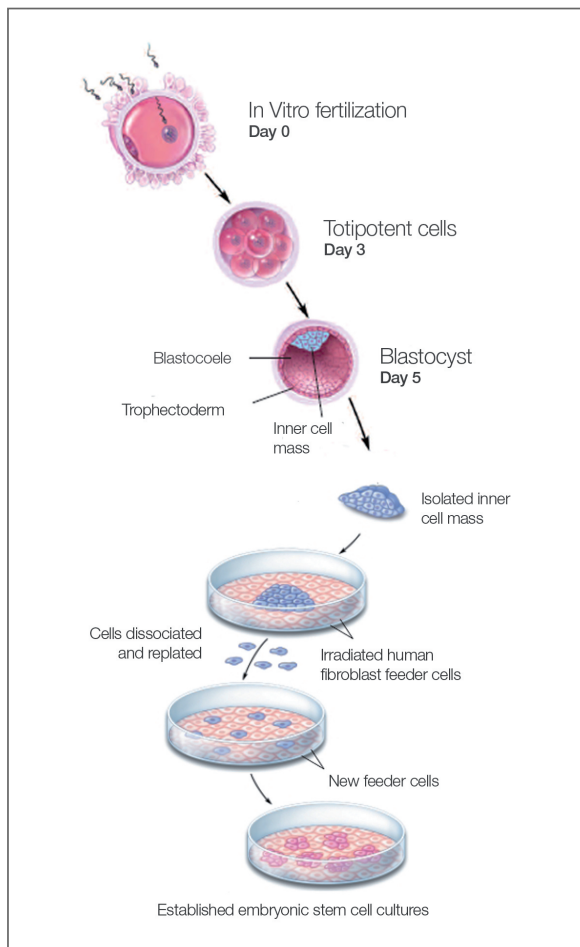


Figure 1

The process of derivation of a human embryonic stem cell line (hESC) from the ICM of embryo 5 days post fertilization. Once the ICM is isolated, it is cultured over a monolayer of irradiated feeder cells. hESC can be maintained in culture indefinitely in their undifferentiated state and with their pluripotency ability intact, as long as appropriate culture conditions are used (modified from: <http://stemcells.nih.gov/>).

3.2.2.3 Induced pluripotent stem cells

In 2007, the group of Shinya Yamanaka described the process of cell reprogramming, through which a somatic cell can be reprogrammed to the pluripotent state (Takahashi et al., 2007). Induced pluripotent stem cells (iPSC) are pluripotent cells with self-renewing ability which have been produced in the lab through induced reprogramming of somatic cells, by means of over-expression of a finite number of factors. This process is known as cell reprogramming and, in principle, any cell in the organism is capable to undergo reprogramming (expanded in session 3.4).

3.2.2.4 Primordial germ cells

Primordial germ cells (PGC) are found in the germinal crest of developing fetuses and are the precursors of the male and female gametes. They originate extraembryonically and, while migrating from the allantois into the embryo, they undergo a series of mitotic divisions that increase their number to a few thousands. Once established in the germinal crests, PGC in a female fetus enter meiosis and will give rise to the oocytes; in the male fetus, they keep their mitotic potential and will enter meiosis only after birth, when the individual will reach puberty, giving rise to spermatozoa. The union of an oocyte and a spermatozoon will give rise to the zygote. PGC, during their migration, acquire an epigenetic imprinting needed to allow a correct embryonic development in order to form a new individual. Once isolated and placed *in vitro*, these cells can give rise spontaneously to germinal stem cells, which have the same pluripotent ability as ESC. For this reason, the PGC are considered pluripotent cells (Shamblott et al., 2001; Shamblott et al., 1998).

3.2.2.5 Spermatogonial stem cells

Spermatogonial stem cells (SSC) are the cells in charge of maintaining the population of spermatogonia in the testicle during the reproductive life of an individual, preserving his fertility. In 2008, the group of Thomas Skutella described for the first time the stable culture *in vitro* of human SSC and the properties of these cells (Conrad et al., 2008). These cells can have characteristics that are very similar to those of hESC in both the expression of pluripotency markers and differentiation ability. These cells are considered totipotent because they can differentiate *in vitro* in tissues of the three germinal layers, and can form teratomas once injected into immunodeficient mice.

3.2.3 MULTIPOTENT CELLS

These cells, also known as adult stem cells (ASC), are found in the fetus and in the adult individual, they are specific of the different tissues and they are in a differentiation state that can be more or less advanced depending on the tissue form which they are extracted. Some ASC are responsible for the maintenance and the regeneration of the tissue in which they reside throughout life, and for this reason are considered self-renewing cells.

ASC are found in the majority of adult tissues, like bone marrow, skin, some specific areas of the central nervous system, fat, intestinal epithelium, etc. The kind of ASC that is most widely and routinely used in cell replacement therapies is the haematopoietic stem cells (HSC). HSC are found in the bone marrow and in umbilical cord blood, and have a high capacity for self-renewal *in vivo* and are the cell reservoir for the formation of all blood lineages (Weissman and Shizuru, 2008). These cells have been used since 1989 to treat hematological problems like some kinds of leukemia and anemia (Gluckman et al., 1989). In the case of the skin, the most recent theory postulates that there is one common epidermal progenitor, which is capable of maintaining the homeostasis of the whole tissue (Clayton et al., 2007). On the other hand, it has been shown that the epidermis, the hair follicles and the sebaceous glands do possess specific progenitor cells, but that these progenitors can migrate into other tissues to repair them, in case the resident stem cell population has been lost (Fuchs and Horsley, 2008). Also, the existence of adult nervous stem cells has been demonstrated, and these cells have the ability to differentiate all the way to mature neurons. There are only two areas in the human brain where the existence of neural stem cells has been demonstrated: the subventricular area of the lateral ventricles and the sub glandular area of the *gyrus dentatus* in the hippocampus (Gage, 2000; Jessberger et al. 2008).

ASC are committed to differentiate into a specific terminal population, even if some of them, like the mesenchymal stem cells (MSC) do have a certain plasticity and can differentiate not only into tissues of mesoderm lineage like osteoblasts, chondrocytes, and adipocytes, but also towards other cell population of the ectoderm lineage like neurons and astrocytes (Meirelles Lda and Nardi, 2009). The presence of MSC has been demonstrated in the stroma of many organs in the organism, where they contribute to the homeostasis of the tissue (da Silva Meirelles et al., 2006).

At the beginning it was believed that the ASC were not completely committed to the tissues in which they were found, and that for this reason it was thought that trans-differentiation (i.e. become a cell type which is on the same developmental route as the starting cell) to other tissues would be easier. Moreover, the use of these cells did not raise any ethical issue, as they come from the same patient and therefore eliminate the need to use a pre-embryo to derive them. The biggest problem that these cells present is that ASC are difficult to maintain *in vitro* in their multipotent state, and for this reason they are used mostly in intrasurgical protocols, or without cryopreservation of cell population that are enriched for ASC, as it is the case for MSC and HSC. In the case of the MSC, it has been shown that their therapeutic potential is not due to their repopulation and/or trans-differentiation in the damaged tissue, but rather to their ability to secrete bioactive molecules with immunomodulators, angiogenic, antiapoptotic and chemotactic ability (Abdi et al., 2008; Nauta and Fibbe, 2007).

3.3 EMBRYONIC STEM CELLS

Since the first report of the isolation and culture *in vitro* of mouse ESC (mESC) in 1981 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981), they have become in a promise for the future of fields such as regenerative medicine, cell therapy and biotechnology.

The pluripotent ability of these cells was quickly demonstrated by their ability to form viable chimeras, contributing to all the tissues of the ensuing organism, including the germinal line, once injected into a mouse blastocyst. Thus, mESC have become a fundamental tool in the biotechnology lab, where it

is possible to manipulate genetically the embryonic cells in order to make a transgenic mouse, custom made for a specific goal. This allows for the creation of animal models of human diseases and can be used as a tool to understand new molecular mechanisms of disease.

It is not until the year 1998 that the first hESC lines were derived by the group of James Thomson (Thomson et al., 1998). This first derivation defined the criteria that a cell line must possess in order to be considered stem: 1) the line needs to be derived from a pre-embryo at the preimplantation stage, 2) the cells need to show the ability to remain undifferentiated in culture, 3) the cells must possess the ability to have stable differentiation ability to form tissues derived from the three germinal layers.

The subsequent derivations of hESC have been made by Reubinoff (Reubinoff et al., 2000) in the year 2000, thus confirming the results obtained by the first reports. In the case of hESC, the pluripotent ability of the cells cannot be demonstrated by their contribution to the formation of a chimerical individual, as this would mean using an assay completely unacceptable from the ethical point of view. For this reason, the pluripotent ability of hESC has been demonstrated so far mainly by *in vitro* differentiation protocols towards multiple tissues of all germinal layer origin, and by the ability that these cells have to induce *in vivo* teratomas, which are tumors composed by tissue like structures well organized, proceeding again from all the three germ layers, once injected in immunodeficient mice.

The differential potential of these cells has revolutionized the field of cell therapy and regenerative medicine. At the moment, there are numerous laboratories around the world that have used pre-embryos to derive hESC with different methodologies (expanded in session 3.3.2). The pre-embryos that are used for the derivations are coming from IVF programs, and are pre-embryos donated for research by couples that have fulfilled their reproductive needs. This is one of the options that can be chosen according to some legislative frameworks, like for instance by the Spanish state. Another source of material for hESC derivations are pre-embryos derived from programs of preimplantation genetic diagnosis (PGD), which are eliminated after having chosen the normal pre-embryos in couples at high genetic risk.

3.3.1 BIOMEDICAL IMPORTANCE OF hESC

As previously mentioned, one of the main characteristics of hESC cells is their ability to form any type of tissue in the body. This same ability is the one that have caught the attention of researchers in ESC, and the main objective of these researchers has been to understand the mechanisms that regulate and guide the specific differentiation of ESC in order to control these same processes *in vitro*. When this will be possible, we will be able to think about applying hESC based therapy to treat or at least control many diseases that are caused by cellular loss of function (expanded in session 3.5).

hESC are a complementary tool to existing animal models to understand the molecular mechanisms that control the human embryonic development in its early stages, and to study the factors that determine the commitment of a pluripotent cell to the germinal line (Dvash et al., 2006). At the same time, they help in understanding which is the hierarchy of expression of key genes at play during cell differentiation up to a mature cell population with a high degree of specialization (Clark and Reijo Pera, 2006; Meyer et al., 2009), generating an *in vitro* model of human embryonic development up to the neonatal stage (figure 2).

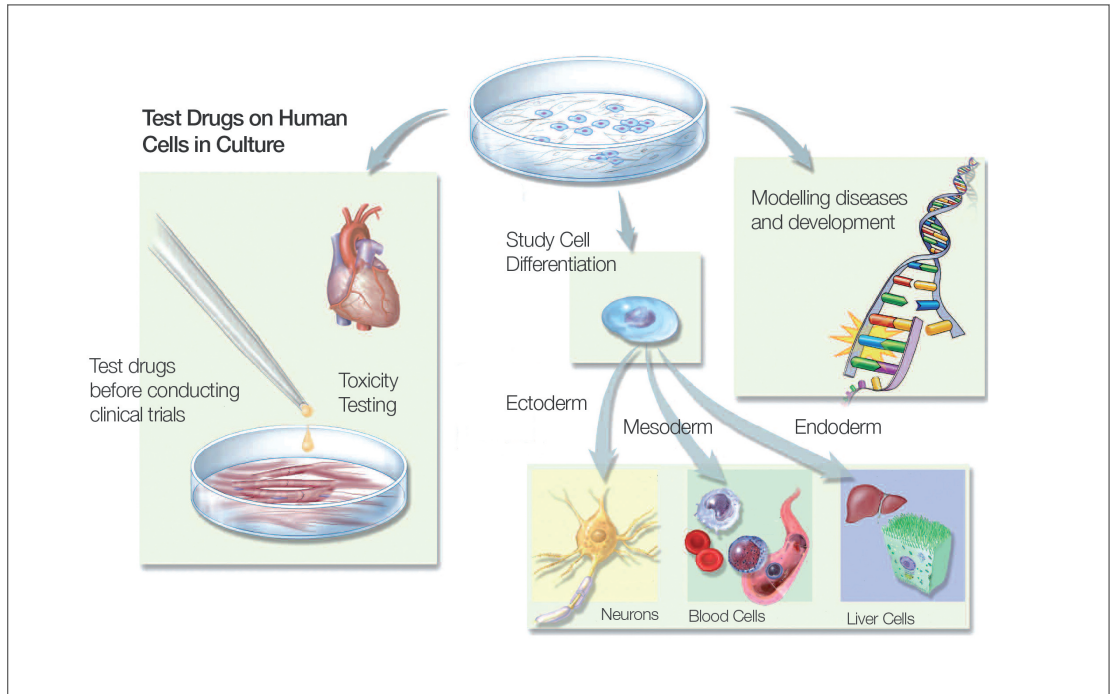


Figure 2

Possible applications of hESC lines. hESC can be used as a human *in vitro* model to test the toxicity and functionality of new drugs and chemicals. Also, they can be used in differentiation studies to investigate the mechanisms that regulate differentiation of human cells, and to establish protocols that allow for the production of cell types for future clinical applications. hESC are also a tool to establish disease models and models of development. (Modified from: <http://stemcells.nih.gov/>).

Disease specific hESC lines obtained from pre-embryos discarded after PGD specific for diseases like for example cystic fibrosis (Pickering et al., 2005), Huntington's disease (Mateizel et al., 2006), and fragile X syndrome (Eiges et al., 2007), are an invaluable tool to study these diseases. On the other hand, the possibility to modify genetically the normal lines allows for the use of these cells for the study of genetic diseases of known source. For instance, Urbach et al have used the Lesch-Nyhan disease as a model by means of the knock down of a gene *hprt1* by homologous recombination (Urbach et al., 2004). Once the line have been created through transgenesis or by using an affected pre-embryo for the disease at hand, it becomes possible to study the mechanisms that impede the development to a certain cell type, or which is the mechanism that alters the correct function of that specific cell population (Abdul Kadir et al., 2009; Catalina et al., 2009; Saha and Jaenisch, 2009). In order to use these cells as model of disease, it has been necessary to develop protocol of differentiation towards the cell types that are needed to study a specific disease (figure 2).

The differentiation ability of hESC makes it possible to obtain differentiated cells and to establish *in vitro* models of diseases such as Parkinson's, diabetes, or myocardial infarction. In 2001, Assady et al (Assady et al., 2001) has differentiated insulin producing pancreatic cells from hESC. From that moment many more groups have developed new differentiation protocols that optimize the derivation of pancreatic derivatives from hESC in terms of functionality and efficiency (Liew et al., 2008; Phillips et al., 2007). Other differentiation protocols have been described, like for instance the spontaneous differentiation towards cardiomyocytes (Kehat et al., 2001), and cells that have a physiological functionality (Satin et al., 2004). Also, a very large effort has been made in order to find efficient differentiation protocols to derive haematopoietic precursors, in order to substitute traditional therapeutic option based on bone marrow or umbilical cord blood (Kaufman et al., 2001; Ledran et al., 2008). Another very broad field of research is the differentiation of pluripotent cells towards neural precursors (Itskovitz-Eldor et al., 2000), especially towards dopaminergic precursors to mitigate the effects of Parkinson's disease (Ko et al., 2009; Zhang and Zhang). Although this is a constantly evolving field of investigation, in the majority of instances no optimal differentiation condition to produce functional cell types have been identified so far.

hESC are also a tool with a great potential for the pharmaceutical industry when it comes to testing new drugs on a large scale (figure 2). In this sense, the hESC have two major advantages: on one side they represent a better *in vitro* model than mESC to evaluate the toxicity of novel molecules on human and therefore can diminish the number of experimental animals, with both an ethical and economical improvement (Krtolica et al., 2009). On the other side, their differentiation ability into any tissue makes hESC a source of cells that are rare or difficult to obtain habitually (e.g. cardiomyocytes in human) (Steel et al., 2009) and that allow to test both the toxicity and the activity of new candidate molecules on the differentiated tissue of interest.

3.3.2 hESC DERIVATION

Currently, there are roughly 600 hESC lines derived and registered in the world, according to the European Registry of hESC (www.hescereg.eu; (Borstlap et al., 2008)).

The derivation process consists in isolating the cells that are part of the ICM, in order to obtain a pure population of hESC, and maintain these cells in culture in their pluripotent state indefinitely. These cells have been traditionally obtained from supernumerary pre-embryos produced in assisted reproduction clinics, and later donated for research by the couples once they have satisfied their reproductive needs.

The protocols that have been used for these derivations are almost as heterogeneous as the research groups that have obtained the lines, and there is no consensus on an optimized protocol for the isolation of hESC. Depending on the stage of embryonic development used for the derivation, we can divide the derivation strategies into 3 categories: derivation from the ICM of the blastocyst, derivation from the pre-embryo at the compacted morula stage, and derivation from a single blastomere after embryo biopsy (figure 3).

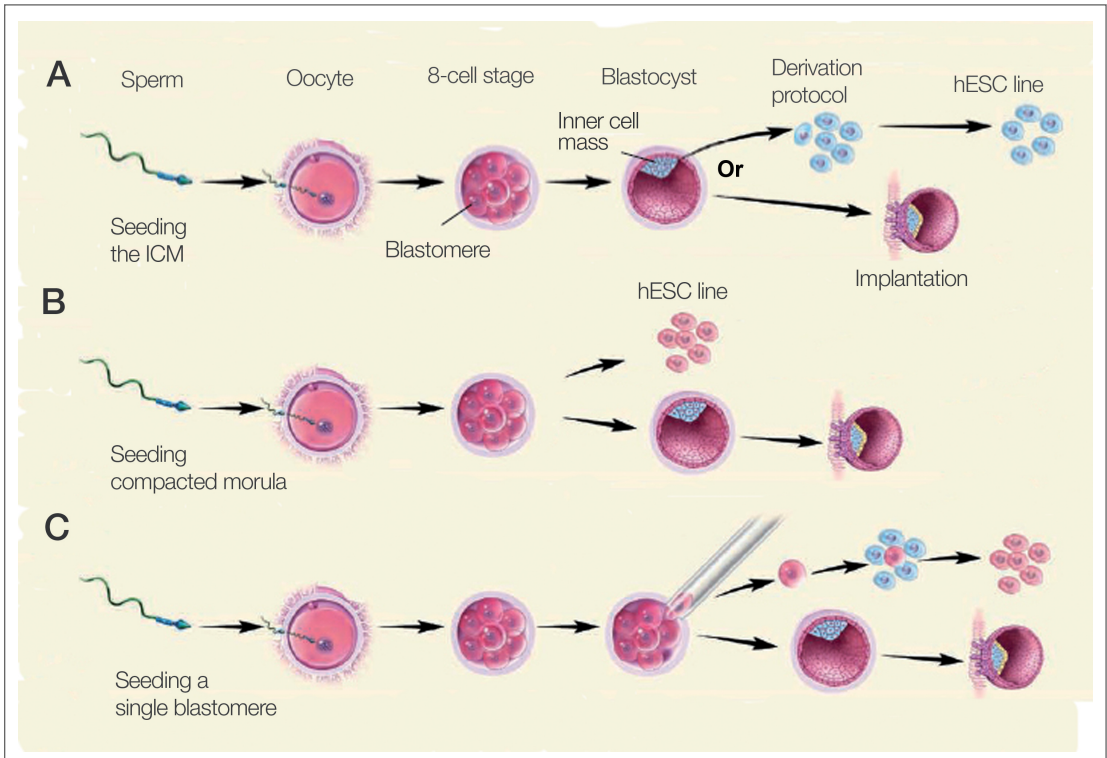


Figure 3

hESC derivation methods depending on the stage of embryonic development. A, derivation from the ICM of an embryo 5-10 days post-fertilization. B derivation from morula stage embryo at day 4 post-fertilization. C, derivation from a single blastomere from embryo biopsy at day 3 post-fertilization. (Modified from: <http://stemcells.nih.gov/>).

3.3.2.1 Derivation from the inner cell mass of the blastocyst

This method is the most commonly used for the derivation of hESC (Thomson et al., 1998) (Reubinoff et al., 2000). The pre-embryo is cultured until days 5 to 9 post fertilization, until it reached the stage of blastocyst. The cells of the ICM are the ones that will give rise to the hESC in determined culture conditions in vitro (figure 3A). At this stage one must try to separate the ICM from the trophectoderm, which will render more difficult the proliferation and viability during the first stages of hESC growth. This last method is the one we employed for the derivation described in papers 1 and 2. Depending on the method used for the isolation of the ICM, we can distinguish the methodology in three categories: whole pre-embryo plating, ICM isolation by immunosurgery, and physical isolation of the ICM. In all the methods, it is necessary to eliminate the zona pellucida (ZP) before seeding the pre-embryo by means of an enzymatic digestion with Pronase, or chemically by an acidic Tyrode's solution.

The simplest strategy is the seeding of the whole pre-embryo. This strategy is preferentially used when it is hard to distinguish the ICM from the trophectoderm, or when the technology needed for the ICM dissection is not available. This method has the advantage of being simple, given the fact that there are no manipulations of the pre-embryo involved. On the other hand, however, it has the important disadvantage of being the method in which there is very little elimination of trophectoderm in relation to the ICM, and for this reason in the technique with the lowest success rate.

A more sophisticated strategy is the ICM isolation by immunosurgery (Solter and Knowles, 1975). This strategy aims at eliminating as much as possible the trophectoderm, while leaving the cells of the ICM intact. This system can only be used if the trophectoderm is intact, thus isolating the ICM, confined in the internal compartment of the pre-embryo's blastocoel, because the antibody and the complement can recognize the ICM cells as well, and they would destroy it just as they do with the trophectoderm.

The physical isolation of the ICM is a good alternative because the elimination of the trophectoderm increases the probability of derivation success. So far two strategies have been described for the physical isolation of the ICM without any enzymatic strategy, immunological or chemical. A first strategy is the mechanical isolation of the ICM which is carried out by dissecting the pre-embryo with special fine needles, and cut the portion of the pre-embryo where the ICM is found (Strom et al., 2007). This technique however, has the drawback that it is very difficult to avoid completely the contamination with trophectoderm cells, as they are adherent to the external part of the ICM. The other strategy is the laser assisted isolation of the ICM, where it is possible to cause damage to the trophectoderm cells, so that their viability is reduced. If the location of the ICM is very clear it is also possible cut away the vast majority of the trophectoderm on the side of the pre-embryo opposite to the ICM. This technique as well doesn't always allow for complete elimination of the trophectoderm cells, but it does allow for damage of the majority of the trophectoderm (Turetsky et al., 2008; Cortes et al., 2008). This method has been used in the paper 2.

3.3.2.2 Derivation from the pre-embryo at the compacted morula stage

The derivation of hESC lines from pre-embryos at the morula stage has been described by Srtelchenko et al in 2004 (Strelchenko et al., 2004). This technique consists in whole pre-embryo seeding at the compacted morula stage (figure 3B). The cells that are part of a compacted morula are totipotent, as they have not formed yet any differentiated cell population, and for this reason during the derivation they can give rise to cells of the trophectoderm as well as to cells of the ICM before the culture is stable, which can compromise the success of this strategy.

3.3.2.3 Derivation from a single blastomere

This strategy, described by the group of Robert Lanza (Chung et al., 2008; Klimanskaya et al., 2006) has the advantage of not requiring the destruction of the pre-embryo in order to derive an hESC line from it, therefore bypassing the ethical problem posed by the destruction of a human pre-embryo for research purposes. In order to perform this strategy, first of all it is necessary to perform a pre-embryo biopsy just as if we would be performing a preimplantation genetic diagnosis in order to obtain a single blastomere from a pre-embryo at the stage of non-compacted morula (figure 3C). In the first experiment

(Klimanskaya et al., 2006), this single cell is co-cultured for a few days in the presence of an established hESC line, which will provide for an optimal environment for its growth. In the second experiment (Chung et al., 2008), the optimization of this technique has allowed the derivation of a line in the absence of hESC, and the original pre-embryo is preserved. The pre-embryo could then be used with a reproductive finality during a standard cycle of assisted reproduction. In the case that the derivation of the line and the pregnancy are both successful, the individual born will have a hESC line physiological and with his/her genetic profile.

3.3.3 CULTURE METHODS

There has been a lot of investment among research groups and biotechnology companies into the optimization of the culture methods for hESC. The evolution of these methods has aimed at the development of culture media more and more defined in order to control the factors that allow for the maintenance of pluripotency and to identify those that allow for a guided differentiation. In the same way, there has been a clear tendency towards the elimination of animal serum derivatives, and in general of those components that imply a xeno-derived contamination.

The hESC also possess the natural ability to continue spontaneously their embryonic developmental program towards the three germ layers. For this, the key of the methods developed to culture hESC is to maintain them indefinitely in their undifferentiated state. From the very first derivations, the culture medium has improved its ability to maintain a stable culture of hESC. In 2000 it has been shown how the basic fibroblast growth factor (b-FGF, also known as FGF-2) has a strong ability to keep hESC undifferentiated, and at the same time to improve subcloning efficiency (Amit et al., 2000). From that moment on, b-FGF has become an essential growth factor for all media formulated to maintain hESC stably undifferentiated in culture.

In the last few years, many different culture conditions that maintain hESC stably have been described. Here below we describe the main culture methods available:

3.3.3.1 Substrates for hESC culture

The classical culture method implies the use of cells that give a paracrine and physical support for the growth of hESC. The support cells provide fundamental growth factors for the maintenance of pluripotency in hESC lines (Chin et al., 2007). When hESC cells are co-cultured with support cells, the colonies that form tend to be compact and with a spongy texture and tend to grow more in terms of volume, and are not very intimately joined with the plate substrate. This allows for a mechanical subculture of the colonies with specific tools that allows for the formation of small aggregates of cells, thus avoiding the use of enzymatic methods. This mechanical strategy avoids the development of chromosomal anomalies that can appear during the prolonged culture time, because it lightens the selective pressure when compared with enzymatic methods (Draper et al., 2004; Spits et al., 2008).

So far, many cell types have been described which have the ability to support the culture of hESC. The first derivations of hESC have been obtained by co-culturing the pre-embryos over a feeder layer of mouse embryonic fibroblasts (MEF) (Thomson et al., 1998). It has been observed that the factors

secreted by the MEF during co-culture with hESC are fundamental to maintain their pluripotency. Later, it has been shown that mitotically inactivated human fibroblasts from foreskin biopsies (HFF) could also allow for hESC culture (Hovatta et al., 2003). This is the method that we have employed in papers 1 and 2. In this way, people were able to avoid the use of cell of animal origin, eliminating one of the most common xeno-contaminants in hESC culture. Shortly later, the co-culture of hESC with autogenic (i.e. derived from the same hESC) fibroblasts was described, and this represented an important step towards the elimination of allergenic elements from hESC culture. This methodology consists in differentiating hESC into fibroblasts, and then using them to support the growth of the same hESC from which they have been differentiated (Choo et al., 2008; Stojkovic et al., 2005; Wang et al., 2005). This way, it is possible to avoid the genetic contamination of the hESC and to eliminate the risk of transmission of pathogens from the sample of donated fibroblasts used for the culture. Up to date, other cell types have been described that have the ability to support hESC culture, such as fetal fibroblasts from the human lung (Chavez et al., 2008), fusiform cells differentiated from umbilical cord cells (Zhan et al., 2008), MSC (Choo et al., 2008), cells of the endometrium (Lee et al., 2005) and cells from the human fetal liver (Ji et al., 2009). The factors and the mechanisms of action of these cell types remain, for the most part, unknown.

An alternative to co-culturing hESC with other cell types is the culture over proteic matrices. Culturing of hESC in a feeder free system is to date a relatively common method, and it presents clear advantages and similarly clear drawbacks compared to a feeder based culture. The main advantage is the possibility of culturing hESC without any contamination from other cells, and for this reason it allows for the collection of cell samples to perform any kind of biochemical test that requires a pure population (e.g.: qualitative and quantitative gene expression, promoter methylation analysis, southern blots, protein extraction and analysis, etc.). Moreover, the contamination with other cell types implies a problem in terms of a possible therapeutic application of hESC because it can increase the immunological reaction if another cell population is contaminating the first one. Also, this method allows for a faster and more efficient enzymatic expansion. Finally, the use of proteic matrices allows to maintain the culture in conditions that are more defined and controlled, given the fact that the component secreted by the feeder cells are not completely described. One of the shortcomings of the culture over proteic matrices is that the necessity of using an enzymatic sub-culturing protocol puts the cells under a selective pressure. Studies have demonstrated that the enzymatic methods of sub-culture increase the risk of acquisition of chromosomal anomalies by the hESC, particularly trisomies of the chromosomes number 12 and 17, which increase the cells' ability to propagate *in vitro* (Draper et al., 2004). Therefore, it is important to perform periodically a karyotypical analysis of the hESC lines in order to ensure their chromosomal stability, especially when sub-culturing enzymatically.

Many different kinds of proteic matrices able to maintain a stable hESC culture have been described. We have classified them here into two groups based on their purity. On one hand, we have the matrices of complex composition, and the main representative of this group is Matrigel. Matrigel is an extracellular matrix of a tumor of mouse origin, whose composition is not completely defined and complex (Xu et al., 2001). Another matrix used is the extracellular matrix secreted by MEF as a substrate for the derivation and maintenance of hESC (Klimanskaya et al., 2005). On the other hand have the proteic matrices of defined composition, based on the ability that certain protein of the extracellular matrix have to support the derivation and growth of hESC without feeder cells. As early as 2001 researcher described that laminin alone could maintain the undifferentiated culture of hESC (Li et al., 2005; Xu et al., 2001). Ludwig described in 2006 that a defined mixture of collagen IV, laminin, fibronectin and vitronectin were

able to allow for the derivation and culture of hESC (Ludwig et al., 2006). Also, it has been shown that fibronectin alone or in combination with collagen IV is able to maintain a stable culture of hESC (Lu et al., 2006). Recently, it has been shown that recombinant human vitronectin, a highly pure and defined matrix, supports hESC line culture (Braam et al., 2008).

3.3.3.2 hESC culture media

In the first described derivations of hESC lines, researchers used media supplemented with fetal bovine serum (FBS). It was quickly shown that, because of its richness in growth factors, FBS was inducing the spontaneous differentiation of hESC and was making their maintenance difficult. The vast majority of media that are used today contain proteic derived or purified from an animal source, since this allows for a better standardization of the ingredients and a lower cost. Later, the FBS was substituted with serum replacements such as the Knockout Serum Replacement (KO-SR) (Invitrogen) (Amit et al., 2004), which present a composition that is more or less defined and which contains as main component bovine albumin. This serum substitute allows for the maintenance a stable culture of hESC with a very low grade of cell differentiation. Actually, KO-SR is the most widely used source of protein for hESC culture. Recently, it has been demonstrated that the supplementation of a small amount of FBS to a KO-SR based medium resulted in an increase in the derivation rate of hESC (Chen et al., 2009). We also used this strategy in paper 2.

The current tendency of the research groups that work with hESC is to try to substitute all the components of animal origin with the relative recombinant or of human origin. In this way, the cultures that are free from xenobiotics are clearly closer to a possible therapeutic application, as these methods eliminate completely the possibility of transmitting pathogens of animal origin, and of increasing the immune rejection due to a reaction to the animal origin proteins that have been in contact with the hESC. It was only in 2006 that the first derivation of hESC lines in xenobiotic free conditions has been successful (Ellerstrom et al., 2006). In this case, the authors used human serum instead of KO-SR, but once more the problem of spontaneous differentiation was apparent in the presence of serum derivatives of low purity. Some groups have developed successfully media free from xenobiotics, which should allow for the derivation and maintenance of hESC (Li et al., 2005), while other groups reported how a series of media free from animal components fail to support long term culture of hESC and induce a spontaneous differentiation (Rajala et al., 2007). In the last few years, new media and supplements xenobiotic free have been reported for the culture of hESC. One such example is a medium from Invitrogen, the KO-SR Xeno-Free which, supplemented with the Growth Factor Cocktail Xeno-Free (Invitrogen), tries to substitute the conventional KO-SR (discussed in paper 5). Recently, another medium has been described, called TeSR2 (Stemcells Technologies), which presents a composition which is completely free from animal origin proteins. In our own lab, we have developed a new protein source from human serum which is able to substitute the usual proteic sources used in hESC culture, in a collaboration with the Instituto Grifols, S.A. (Barcelona, Spain, <http://www.grifols.com>) (discussed in paper 5).

Another tendency in hESC culture is the use of media that are chemically defined, in order to understand which are the molecules and the mechanisms that maintain these cultures in a pluripotent state. At the same time, it allows to define better which growth factors are important to direct the cells to differentiate towards a specific cell type. In 2005, Li developed a culture media based on recombinant human growth factors such as b-FGF, stem cell factor (SCF), leukemia inhibiting factor (LIF), and *flt3 ligand* (FL), which

allow for the maintenance and expansion of hESC (Li et al., 2005). Shortly after, the group of Michael Snyder developed a new medium called HESCO, formed mostly by Wnt3, GFG, Insulin, Transferrin, April/BAFF, cholesterol and albumin (Lu et al., 2006). At the same time, the group lead by Sheng Ding developed another defined medium based on the two supplements N2 and B27 (Invitrogen), which allow for the indefinite culture of hESC (Yao et al., 2006). Recently, new defined media have been brought on the market, which have been formulated specifically for hESC culture. An example is the medium mTeSR1, which allows for the culture of hESC without any feeder cells or conditioned medium (Ludwig et al., 2006).

3.3.3.3 Expansion methods for hESC

There are different methods for the sub-culturing hESC in their routine culture. Depending on the culture conditions explained previously, the methods used to expand the cells are either through a mechanical or an enzymatic technique.

The mechanical strategy consists in breaking the hESC colonies into small pieces of 20 to 200 cells, and transferring them to a new plate. This method requires the cells be cultured on a feeder layer because this allows for the formation of denser, more compact colonies on top of them. It is possible to use tools prepared from *Pasteur* pipettes pulled by fire, and also commercial tools like STEMPRO[®] EZPassage[™] from Invitrogen, or plastic capillaries mounted on pipettes that are designed for the manipulation of human pre-embryos (Stripper micropipette, Mid Atlantic, and stripper tips, 150 μ m respectively). Even if this method does not allow for a very rapid expansion of the culture, it does submit the hESC to a very light selective pressure.

The enzymatic strategy consists in the expansion of hESC by using enzymatic solutions that disaggregate the colonies in single cells or in very small groups of cells (about 20 cells each). This method is more indicated when culturing the cells on proteic matrices, as the colonies on these substrates tend to grow flatter and less compact, rendering difficult their mechanical expansion. The enzymes that are usually employed are trypsin, collagenase and dispase. Trypsin is a potent enzyme that disaggregates the colonies up to a single cell solution, while dispase and collagenase have the tendency to break up the colonies in larger chunks, and are therefore considered less aggressive on the cell line. This strategy allows for a rapid and efficient expansion of the cell lines and avoids the possible contamination with other feeder cell population.

3.3.4 hESC CHARACTERIZATION

hESC have very specific characteristics. They are the only cells that have the spontaneous ability to form all cells types of a body. It is important to carry out an exhaustive characterization of the cells in order to define unequivocally the population of hESC and to demonstrate their pluripotency.

The pluripotency assays had the main goal to identify those proteins that are markers of hESC, and later on they demonstrate the ability of hESC to form tissues coming from the three primordial embryonic germinal lines: endoderm, ectoderm and mesoderm, both *in vivo* and *in vitro*.

3.3.4.1 Pluripotency markers

A panel of biochemical and molecular markers has been identified, which define specifically the hESC population. Some of these markers have been previously described in embryonic carcinoma cell and later on the expression of these markers in hESC has been shown (Andrews et al., 1996; Andrews et al., 2005b). In any case, the expression of some of these markers is not exclusive to hESC.

The expression of the alkaline phosphatase (AP) is one of the markers that have been traditionally used. Although AP is not an enzyme exclusive of hESC, it has the advantage of being a marker of fast and easy identification. During the first stages of derivation of a new hESC line, the AP tests can differentiate rapidly if the cells that are expanding are really hESC or rather trophectoderm, or even tissues already differentiated from hESC.

On the other hand, the telomerase activity test is another one of the markers used to characterize a hESC line. Telomerase is a ribonucleoprotein whose main function is to maintain the elongation of the telomeres. The shortening of the telomeres is the main cause of cell senescence and, for this reason, telomerase is expressed in those cell types that need a “young” cell status indefinitely, like for instance germ cells and hESC. hESC lines kept *in vitro* are considered immortals, and can be maintained in culture indefinitely (Miura et al., 2004).

To date, a large panel of pluripotency specific surface markers have been described, and whose expression define the hESC population. In 2005, the ISCI project (International Stem Cell Initiative) was developed, with the aim of establishing a series of criteria to characterize accurately the new hESC lines obtained (Andrews et al., 2005a). The molecules that are considered in this project are more specific markers and they define a more accurate window of pluripotency of hESC, mostly because these markers stop being expressed as soon as the hESC enter a differentiation path. The glycolipids of the Stage Specific Embryonic Antigens (SSEA) family are common markers in the hESC characterization (Andrews et al., 1996; Thomson et al., 1998). More specifically, SSEA3 and SSEA4 are markers of the pluripotent state. When the hESC enter a path of differentiation, they usually activate the expression of SSEA1, which is considered a marker of early differentiation in hESC, while this same protein is a pluripotency marker in mESC. The glycoproteins of the family of the Tumor Related Antigens (TRA) are also markers of hESC (Andrews et al., 1996). Specifically, TRA 1-60 and TRA 1-81 are classical marker checked during the characterization.

Although the mechanisms that maintain the pluripotent state are not completely known yet, many transcription factors and metabolic routes have been described, which are specific of hESC physiology and fundamental to maintain the state of un-differentiation that characterizes these cells. Some of these transcription factors have also been used as markers of hESC, and have so helped in defining the robustness of the mechanisms that regulate the pluripotency of these cells. The classical protein that defines the pluripotent state is OCT4, which is a member of the POU family of transcription factors (Nichols et al., 1998; Niwa, 2001; Scholer et al., 1990). hESC must reach a level of expression of OCT4 well defined in order to maintain their pluripotency, because an increase of the expression over a certain limit will cause the differentiation towards mesoderm and endoderm lineages, while a drop of expression will activate the differentiation towards trophectoderm (Niwa et al., 2000). For this reason this transcription factor represents a specific marker to define the population of hESC. Another factor that plays an important role in defining the pluripotency of hESC is the protein NANOG, of the family of *homeobox*,

which activates other genes that are important for the maintenance of undifferentiated hESC. Unlike OCT4, an elevated expression of this transcription factor does not lead to any kind of differentiation, while, if its level of expression diminish, the hESC do differentiate towards any of the three primitive lineages (Hatano et al., 2005; Hyslop et al., 2005). As the reduction of the expression of NANOG does lead to differentiation, this is a good marker of pluripotency in hESC and a good indicator of their undifferentiated state. The expression of the transcription factor SOX2 regulates the expression of the growth factor *FGF4*, and it is speculated that it might play an important role in maintaining hESC pluripotency as well as in the organization of the differentiation of the early stages of embryonic development (Avilion et al., 2003; Richards et al., 2004).

3.3.4.2 Differentiation capacity

The next step in the characterization entails demonstrate the ability of hESC to form tissues that derive from the three primordial germ layers of the embryo (mesoderm, endoderm and ectoderm) because the fact that the cells can enter any of the three primitive differentiation pathways demonstrates their capacity to form any tissue of an adult organism. There are two main methods to demonstrate this ability: the *in vitro* differentiation test and the *in vivo* one.

The *in vitro* differentiation test consists in culturing hESC in different conditions, which allow for their differentiation mainly to one of the three main embryonic lineages. In the year 2000 Itzkovitz-Eldor et al (Itzkovitz-Eldor et al., 2000) has established a reproducible method to form embryoid bodies (EB) through the culture in suspension of hESC colonies, thus establishing a starting point for many guided differentiation protocols. From EB formation, the hESC can differentiate spontaneously or can also be cultured over different substrates and in different media, which will favor the differentiation towards the cell lineage of interest. The protocols that are used for this test are usually not very refined as their main objective is not to obtain a pure population of cells but rather to highlight the presence or absence of certain cell types that are representative of a determined embryonic lineage.

For the formation of endoderm tissues, the EB are usually cultured in media enriched with FBS over simple substrates like gelatin. Actually, this is an example of a protocol that causes spontaneous differentiation, and it is possible to find small cell populations deriving from all three germinal lineages. In the case of endoderm, after 2 to 3 weeks in culture it is already possible to appreciate globular and glandular structures that stain positive for markers of endoderm such as FOXA2 or α -fetoprotein. Rarely it is possible to get to the identification of terminally differentiated populations with this protocol, but there are specific protocols that allow terminal endodermic derivatives like pancreatic islets that produce insulin and glucagon (Segev et al., 2004) or cells that resemble hepatocytes (Rambhatla et al., 2003).

The differentiation towards mesoderm derivatives can be increased by the supplementation of the medium with molecules like ascorbic acid, DMSO, azacitidine, cyclosporine A or growth factors such as Wnt3, Activin A, BMP-4, and BMP-2. These culture conditions potentiate especially the population of muscular derivatives like functional cardiomyocytes that are identified by the expression of α -sarcomeric actinin and GATA-4 or cells of the smooth muscle that are identified by smooth muscle actin. The cells of the first kind are especially useful during the characterization of the lines as they become rhythmically beating in culture, and this facilitates their identification even without any staining or molecular quantification (Kehat et al., 2001; Xu et al., 2002). There are also defined protocols for the derivation of other mesoderm

derivatives like the haematopoietic progenitors CD45+ and Cd34+ (Chadwick et al., 2003; Kaufman et al., 2001; Vodyanik et al., 2005), see paper 4 and 5, endothelial cells that express PECAM1, vWF and human VE-cadherin (Levenberg et al., 2002) or populations belonging to the chondrogenic line that express specific markers like SOX9, type II collagen and proteoglycans (Khillan, 2006; Sui et al., 2003).

The culture condition for the formation of the ectodermic derivatives (especially neuro-ectodermic) present the most peculiarities, but at the same times are also the most effective, perhaps because of a spontaneous tendency of hESC or because the current culture conditions of hESC condition them somehow towards this lineage. In general the protocols use media that are free from any serum derivative but enriched with supplements that are traditionally used to culture neurospheres, such as N2 and B27. In order to improve the differentiation towards these populations, the EB can be cultured over brain stroma cells like the cell line PA6 in order to produce a large amount of neuronal derivatives. In the literature there are numerous protocols to obtain neurons that are positive for β -tubulin (Reubinoff et al., 2001; Zhang et al., 2001), including dopaminergic neurons positive for tyrosine hydroxylase (Perrier et al., 2004; Schulz et al., 2004), and glial cells like astrocytes which are positive for specific markers like GAF, or oligodendrocytes.

The test of differentiation *in vivo* consists in inducing the spontaneous differentiation of hESC once injected in SCID (severe combined immuno-deficient) mice. The cells proliferate and differentiate in the tissue where they are injected and ultimately form a teratoma that contains multiple tissues differentiated from the three primordial germinal layers. Of the mesoderm lineage, it is common to find both smooth and striate muscles, cartilage and bone; from the endoderm is common to find primitive gut epithelium, respiratory epithelium, structures resembling renal glomerula, and many glandular structures; from the ectoderm it is normal to find groups of neurons, glia and epidermis (Przyborski, 2005).

The most common injection sites are subcutaneously in the inter-scapular region, intramuscular in the gastrocnemius muscle, intratesticular, below the kidney capsule, and intrahepatic. Depending on the injection site, the kind of tissues forming the teratoma can vary. While the teratoma that form in the subcutaneous compartment are usually made up by mature tissues and grow slowly, the teratoma that form in the liver grow faster and are formed by more undifferentiated tissues (Cooke et al., 2006). This difference is probably due to a different range of growth factors released by each organ, as well as a different degree of vascularization, space for growth, etc.

3.4 INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS

During the last 3 years there has been a scientific revolution in the field of embryonic stem cells and regenerative medicine because of the discovery of iPSC. iPSC are derived from the somatic cells of a fetus or an adult individual after transduction with determined transcription factors. These transcription factors start to be expressed in the somatic cells inducing or repressing in turn other genes, which, in a period of 12 to 40 days, make this cell, which in the beginning had a very clear differentiated state, show a phenotype that is similar to that of ESC and becomes pluripotent. This method, named induced reprogramming, allows that a cell in its terminal or very advanced state of differentiation acquire the pluripotency ability that is typical of an ESC.

Since the successful cloning of a vertebrate (Gurdon and Uehlinger, 1966) and later of a mammal using a terminally differentiated cell as nuclear donor (Wilmut et al., 2002), the possibility of reprogramming the nucleus of a somatic cell to a state of pluripotency became a reality. Later on it has been shown that, when fusing together two cells of different kinds, the larger and more mitotically active was able to impose its pattern of gene expression to the other cell type (Harris, 1967). These experiments demonstrated that there are molecular components in the cytoplasm that are able to migrate in an exogenous nucleus and to direct its expression profile (Reviewed in (Gurdon and Melton, 2008)). On the path of these experiments, in 2006, Shinya Yamanaka reasoned that nuclear proteins must exist in ESC that are capable of reprogramming a somatic cell. Therefore, he selected 24 candidate genes and he over-expressed them in somatic cells obtaining as a result reprogrammed cells that showed characteristics typical of ESC. Of the initial 24 genes, he selected 10 that were indispensable to produce cell reprogramming, but in later experiments he demonstrated that the combination of just 4 factors (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* and *c-Myc*) was able to generate iPSC from mouse fibroblasts (miPSC) (Takahashi and Yamanaka, 2006). The cell lines that were produced in these experiments had morphological characteristics, pattern of marker expression, and differentiation ability that were very similar to those of mESC. However, the cells obtained in those first experiments were not able to contribute to the formation of a chimerical mouse once injected in a blastocyst, thus highlighting a limited differentiation potential.

Shortly later, the same group of Yamanaka (Okita et al., 2007) and other two independent laboratories (Maherali et al., 2007; Wernig et al., 2007) were able to induce miPSC with a more complete reprogramming status using a strategy quite similar to the previous one, but using either *Oct4* or *Nanog* expression as a selection criteria to select for reprogrammed cells. The cell lines obtained in this way were able to form chimeras and to contribute to the germline of the chimerical animal, thus demonstrating their pluripotency.

Just a year after the description of iPSC in mouse, the same group headed by Yamanaka achieved the reprogramming of human fibroblasts to iPSC (hiPSC) (Takahashi et al., 2007), using the same 4 factors that were employed to reprogram mouse cells (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4* and *C-MYC*). Almost at the same time, 3 other groups independently reported similar results (Lowry et al., 2008; Park et al., 2008; Yu et al., 2007). Shortly later, our own laboratory achieved the reprogramming of human keratinocytes (Aasen et al., 2008). This last study demonstrated that the efficiency of reprogramming could depend on the cell type employed. When starting from keratinocytes, the reprogramming efficiency (1%) was significantly higher than that so far reported using fibroblasts (0.01%). The hiPSC lines generated presented morphological characteristics almost identical to hESC. Moreover, they presented a pattern of pluripotency marker expression and differentiation ability *in vitro* very similar to that of hESC.

More recent reports have underscored the fact that probably we have not reached yet the perfect combination of either number or kind of transcription factors to reach an ideal reprogramming. Actually, two research groups (Nakagawa et al., 2008; Wernig et al., 2008a) have described in 2008 that the oncogene *C-MYC* is in fact not necessary for reprogramming, although its absence makes the process slower. The starting cell type population is also important in reprogramming, because cells that have a certain degree of pluripotency can be reprogrammed faster, more efficiently and with less factors. Recently it has been shown that neural stem cells can be reprogrammed by over-expression a single factor: *OCT4* (Kim et al., 2009b), although this cell population is clearly of very difficult access. Our own group has recently described how cryopreserved umbilical cord blood HSC can be reprogrammed

to hiPSC in a short period of time with just the two factors *OCT4* and *SOX2*. (See papers 6 and 7).

In all the reprogramming experiments that have been described in this section, retroviruses or lentiviruses have been used to induce the expression of candidate genes. These viral strategies imply the permanent integration of the transgenic constructs in the genome of the somatic cell, which in turn can lead to an unbalance of the physiological functioning of the resulting pluripotent cell (expanded in session 2.3). Recently, new reprogramming strategies have appeared, which allow for the reprogramming of human somatic cells without any integration into the somatic cell genome by means of episomal vectors (Yu et al., 2009) or recombinant transcription factors in protein form (Kim et al., 2009a) (figure 4).

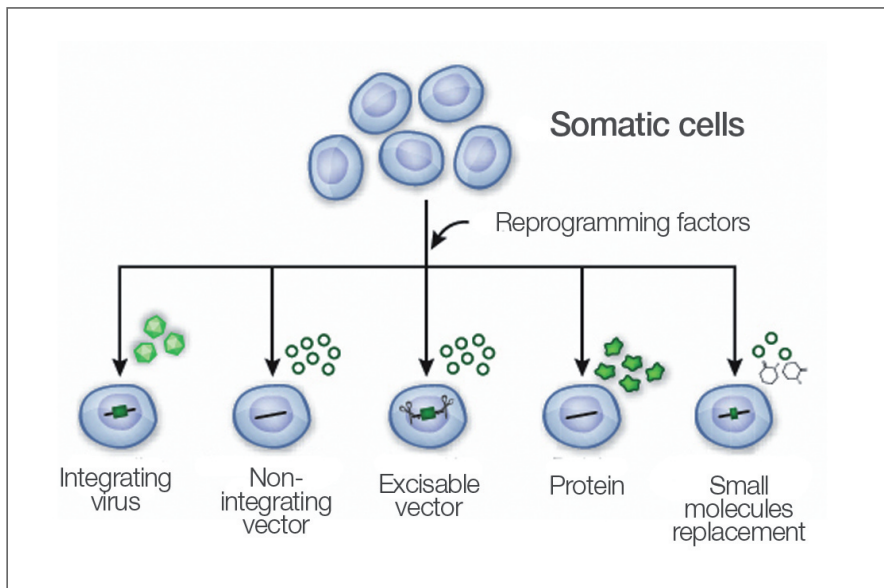


Figure 4

Methods for reprogram somatic cells to induced pluripotent stem cells (iPSC). The methods to induce the over expression in the somatic cells of reprogramming factors include integrating DNA with or without later excision of the exogenous material and non integrative strategies with DNA, proteins or chemical compounds. (Modified from: de Souza).

So far there have been many reports that point to the fact that there are many different combination of strategies and factors which can be used to reprogram somatic cells and almost all the classical factors with the notable exception of *OCT4* can be substituted for other equivalent (Reviewed in Kiskinis and Eggan, ; Yamanaka, 2009).

3.4.1 Similarities and differences between ESC and iPSC

Generally, it can be said that iPSC and ESC have many more characteristics in common than differences. This is true when talking of reprogrammed cell lines that have silenced the expression of the exogenous genes and that maintain the endogenous expression of their transcription factors (Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007).

From the point of view of the morphological characteristics and the optimal culture condition, there is no difference between hESC and reprogrammed cells. Once the culture of the lines has been established, hiPSC colonies are comprised of compact groups of small cells with a high nucleus to cytoplasm ratio, very similar morphologically to hESC. In the same way, the culture methods, specifically the media and substrates utilized, are the same described for hESC.

In order to demonstrate the pluripotency of hiPSC it is necessary to perform a characterization that is very similar to that used for hESC. hiPSC are positive to the staining for AP and they express the same pluripotency markers that define the hESC population: *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*, *SSEA3*, *SSEA4*, *TRA 1-60*, and *TRA 1-81*. hiPSC also express telomerase.

As far as their differentiation ability is concerned, miPSC can contribute to chimeras with germline contribution (Okita et al., 2007), even when mixed with tetraploid embryos which will only develop into the extraembryonic membranes, thus presenting an even more stringent proof of pluripotency (Kang et al., 2009). With hiPSC is not possible to demonstrate the ability to form chimaeras for ethical reasons, exactly as it happens with hESC, but it has been shown that they present differentiation ability *in vitro* towards all the three germ layers and the formation of teratomas that are very similar to those formed by hESC.

In the analysis of the global level of gene expression by microarray done comparing the original somatic population, the hiPSC obtained from them, and hESC, it is possible to show that the global gene expression of hiPS is very similar to that of hESC while differing significantly from the starting population (Aasen et al., 2008; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). As far as the epigenetic reprogramming is concerned, it has been shown that in hiPSC the promoters of pluripotency genes are demethylated, and that in hiPSC of female origin the inactive X chromosome gets activated, two characteristics of hESC lines (Maherali et al., 2007). This demonstrates that reprogramming is a complex process that modifies the global gene expression of the somatic cells, bringing it closer to an epigenetic and expression profile that is typical of hESC.

Recently, it has been demonstrated that hiPSC lines that retain, integrated in their genome, the reprogramming transgene, present a profile of gene expression that is slightly more distant to that of hESC compared to the same hiPSC once the genetic integrated transgene has been removed (Soldner

et al., 2009; Yu et al., 2009). This demonstrates that the integration of exogenous genetic material has important repercussions on the expression levels of genes that are not physiological in hESC, surely due to the local influence of the powerful viral promoters used, as well as to the abnormal levels of protein that they code for.

The differential trait between ESC and iPSC is in their origin. While ESC derive from an early embryological stage, iPSC derive from somatic cells that had already concluded a process of differentiation. Actually, as we are going to describe below, part of the differences between these cell types are derived from the remaining memory of the somatic origin of the iPSC.

It has recently been shown that reprogramming of somatic cells cannot be perfect and for this reason there are remaining difference between hiPSC and hESC. Many recent studies demonstrate that hiPSC conserve a residual gene expression of the original somatic cells and for this reason their global expression pattern is different from that of hESC (Chin et al., 2009). Also, it has been shown that hiPSC have methylation status that is significantly different from that of hESC, depending on the tissue from which they have been derived (Doi et al., 2009).

Another fundamental difference between hESC and hiPSC resides in their different ability to give rise to tumors. The two cell types both have the ability to give rise to benign teratomas once injected in immuno-depressed individuals (Blum and Benvenisty, 2008). In the case of hiPSC, however, both because of the integrations of the exogenous DNA in their genome and because of the forced expression during the reprogramming process of oncogenes (e.g.: *C-MYC*), they have the tendency to form teratocarcinomas or to become malignant once differentiated to adult cell populations (Moriguchi et al., 2009). Another differential trait is the different tumorigenicity of different miPSC lines produced from different somatic tissues of origin (Miura et al., 2009). For instance, mESC and miPSC derived from fetal fibroblasts are more similar among themselves because they have the tendency to differentiate terminally and completely when differentiated into an adult cell type (e.g.: animal models of Parkinson's disease) and there is no development of teratomas in the injection site. On the other hand, miPSC lines produced from adult fibroblasts or from hepatocytes are different from mESC in this sense, as they tend to go awry in their complete differentiation, producing a population that is not completely differentiated and that, for this reason, can give rise to teratomas with higher probability.

3.4.2 hiPSC AS DISEASE MODELS

Patient specific hiPSC can be valuable disease models that can be used for both investigation and therapy purposes. hiPSC are obtained from patients that have signed an informed consent form for their derivation and use, and for this reason there is no ethical debate about them, unlike the use of pre-embryos to derive hESC.

hiPSC allows for the development of an embryonic model to study genetic diseases, as a simple biopsy of a patient carrying the disease is enough to establish an hiPSC line specific for this patient and this specific mutation. These cell lines can be used to study *in vitro* the mechanisms that are involved in the development of the disease, and therefore identify the best strategies to develop new drugs. In the case of disease with late insurgency like Alzheimer or Parkinson's, it is difficult to establish *in vitro* cell models because the cell population differentiated from hiPSC specific of the patient might never develop

the phenotype similar to the one found in the *in vivo* situation, due to the very different environmental conditions that are used during *in vitro* culture. In this case, it is better to develop a protocol that will stress the population *in vitro* in a way that will force the appearance of a phenotype of interest *in vitro*. It will also be very difficult to establish *in vitro* models for diseases that have a complex genetic etiology, or that are the result of a combination of genetic and environmental factors (such as for instance myocardial infarction).

Recently, many studies reported the use of hiPSC to create models of genetic diseases. The group of Svendsen has shown that motoneurons differentiated from hiPSC from patients affected by muscular dystrophy show clear functional deficits (Ebert et al., 2009). In a work by Lee et al hiPSC specific from patients with familiar disautonomy have been shown to differentiate into neurons of the autonomous and sensorial system that have the same level of altered gene expression as the patient of origin, and that these neurons can be used to validate new drugs that allow for a correct differentiation and migration of the neurons themselves (Lee et al., 2009). More recently, Ye et al have demonstrated that hiPSC lines derived from CD34+ cells from the peripheral blood of patients affected by myeloproliferative disorder have a normal phenotype, but that, when differentiated towards a hemopoietic precursors, they present an increase of eritropoiesis and an increase in the expression of specific genes, just as it happens *in vivo* in the cell of the patient (Ye et al., 2009).

3.5 CLINICAL TRANSLATION OF PLURIPOTENT CELL BASED THERAPIES

The international scientific community is putting a lot of effort in studying pluripotent cells given their potential applicability. It is important to consider which are the barriers that still exist in this sense, and which are the levels of control that need to be in place in the processes of production and clinical application of therapies using pluripotent cells. As we have seen in sections 3.3.1 and 3.4.2, pluripotent cells can be used to study human diseases, understand their pathogenesis and to find new treatment strategies. The main problems that exist at the moment to use pluripotent cells are: the establishment of protocols for controlled and efficient differentiation, the elimination of the risk immunological rejection from their use, the elimination of the risk of tumorigenesis resulting from cell therapy, and the development of culture systems and methods that will allow for the derivation of these cells at a clinically accepted grade.

3.5.1 ESTABLISHING DIFFERENTIATION PROTOCOLS

Different protocols have been developed, which allow for the clinical translation of hESC research. So far, the clinical research carried out with these cells has been limited to using animal models in order to demonstrate their safety and efficacy. In the mouse it has been shown that therapy with pluripotent cells can get to improve the symptoms of diseases of large prevalence and severity. It has been shown that it is possible to differentiate the hESC to cells of the endocrine pancreas, which, once transplanted into diabetic mice, show high functionality and can alleviate the symptoms of the disease (Kroon et al., 2008; Soria et al., 2005). Also, many studies have been carried out *in vivo* in order to demonstrate the ability of hESC to differentiate into functioning dopaminergic neurons which in turn are able to integrate

into the adult brain of a mouse and to ameliorate the symptoms of Parkinson's disease (Cho et al., 2008; Sonntag et al., 2007). One of the most commonly studied diseases in the field of regenerative medicine is the traumatic lesion of the spinal cord, both for its incidence and for the availability of animal models. Many groups have demonstrated how a hESC based therapy, where the cells have been differentiated into neuroectodermal precursors in order to treat traumatic spinal cord injuries, have resulted in a significant improvement of the affected animal (Cummings et al., 2005; Keirstead et al., 2005; Kumagai et al., 2009; Nakamura et al., 2005). Regenerative medicine also presents itself as a promise in the field of cardiac regeneration and as therapy in myocardial infarction. To date, many groups study how the transplant of myocardial precursors can improve the functionality of the heart by means of the release of growth factors and angiogenic substances after a vascular accident. These studies use many animal models such as mouse, rat, pig and sheep (Kehat et al., 2004; Laflamme et al., 2007; Menard et al., 2005; van Laake et al., 2009). Also, there have been studies in animal models in order to demonstrate the ability of hESC to cure or improve other diseases like the retinal epithelium pigment dysfunction (Idelson et al., 2009) or Huntington's diseases (Aubry et al., 2008). Cell therapy in human using hESC still presents some doubts that need resolving, especially about the safety of the proposed therapies. The Food and Drug Administration (FDA) has recently approved the first clinical assay of this kind. It is an assay proposed by the company Geron Corp. which aims at demonstrating the safety of transplanting neuronal precursors to patients with acute traumatic spinal cord injury. The final product used is a mixture of oligodendrocytes progenitors and of other cells differentiated in Good Manufacturing Practice (GMP) condition from the hESC line H1, which, in turn, was not derived in these conditions (Keirstead et al., 2005; Sharp and Keirstead, 2009).

Recently, many studies demonstrate the potential of iPSC in the personalized treatment of genetic diseases of patients. For instance, it has been shown with a humanized mouse model of Sickle Cell Anemia that they can recuperate a healthy phenotype through the transplantation of hemopoietic precursors differentiated from miPSC obtained from the same mice and genetically corrected (Hanna et al., 2007). In our own laboratory, we have used a similar strategy for the treatment of Fanconi's Anemia (FA) using fibroblasts from patients affected by this diseases that, after genetic correction, gave rise to hiPSC lines which in turn were differentiated to hemopoietic precursors which then presented an healthy phenotype, thus pointing towards a possible treatment for this disease (paper 3 and 4) (figure 5). Also, it has been shown that dopaminergic neurons differentiated from healthy iPSC can produce an improvement of the phenotype in a rat model of Parkinson's disease (Wernig et al., 2008b). Using a mouse model of Hemophilia A, it has been shown that the mice would recuperate partially the coagulation ability after being transplanted with endothelial precursors obtained from miPSC derived from adult mouse fibroblasts (Xu et al., 2009).

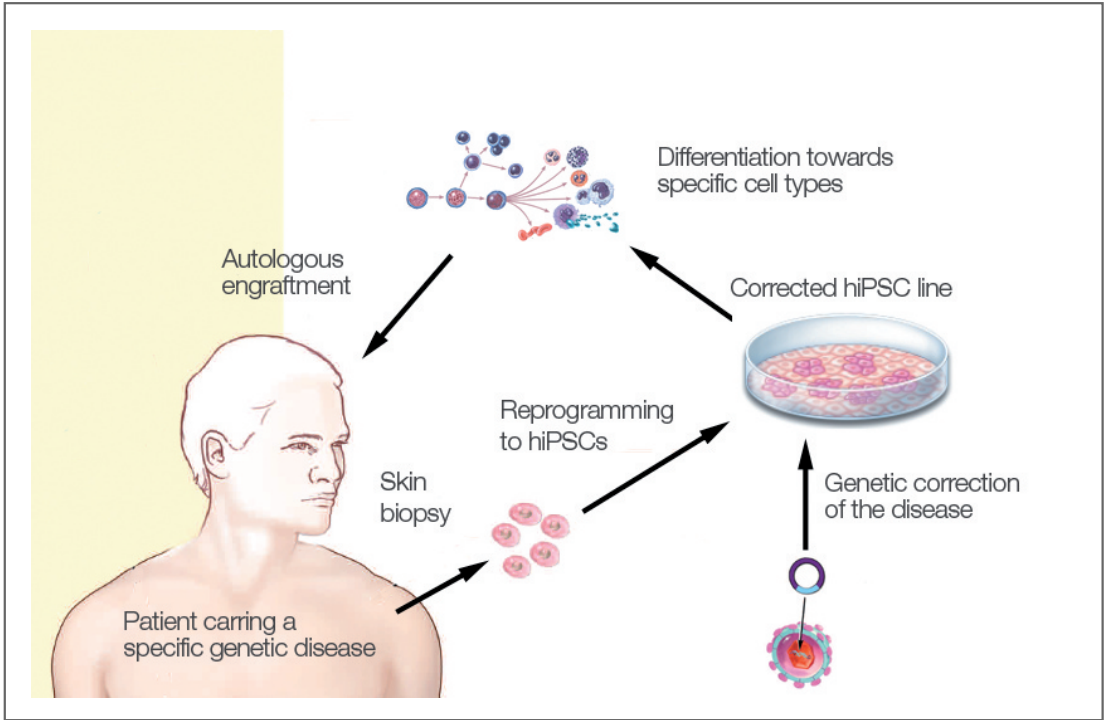


Figure 5

Schematic representation of the treatment of genetic diseases by iPSC based technology. iPSC lines specific for a patient that carries a genetic disease, obtained by a primary skin culture, can be corrected in vitro with viral vectors in order to obtain a healthy phenotype. The resulting iPSC lines can be differentiated towards a cell population of interest and, hypothetically, carry out an autologous transplant to cure the disease in the patient (Modified from: <http://stemcells.nih.gov/>).

3.5.2 IMMUNOLOGIC REJECTION

hESC based therapies can give rise to an immune rejection in the recipient patient as they are of different genetic origin. For this reason, a large amount of hESC lines should be available with haplotypes that cover the majority of the population, in order to guarantee a treatment that minimizes the risk of immunological rejection (discussed in section 3.1).

In the case of hiPSC, this problem is solved because their use would be considered as an autologous transplant and for this reason the risk of immunological rejection is very low, eliminating the need for a treatment with immunosuppressive drugs. At the same time, there is the hypothetical possibility to correct the disease at the molecular level and obtain a progenitor population of the target organ free from the disease, and once transplanted with these precursors, the patient could recuperate the

functionality of the organ without immunological rejection.

3.5.3 TUMORIGENIC RISK

Before the eventual use of hESC and hiPSC in clinical assays, it is very important to be able to insure a certain degree of security and control of the therapeutic process, given the fact that the main problem for the clinical therapy with pluripotent cells is the minimization of the tumorigenic risk. We already discussed the differences between hESC and hiPSC in terms of tumorigenic ability, hESC and hiPSC giving rise to benign teratomas, but hiPSC also to malignant tumors. Recently the need to ensure the safety of cell therapies has become even more apparent, as a recent study shows how the therapy with fetal neural stem cells give rise to multifocal tumors just a few years after its application (Amariglio et al., 2009). In order to orientate the researchers on the necessary steps required to translate to the clinic the therapy with pluripotent cells, the International Society for Stem cell Research (ISSCR) has released guidelines for the responsible application of stem cell based technologies in patients that might need it. These guidelines are compiled into The Guidelines for the Clinical Translation of Stem Cells (www.isscr.org, (Hyun et al., 2008)). In order to ensure their safety, it is fundamental to establish reproducible protocols that will allow the isolation of pure and controlled populations of candidate cells for disease treatment.

3.5.4 CLINICAL GRADE CELL PRODUCTION AND CULTURE CONDITIONS

The level of optimal control for the development and application of any kind of clinical grade therapy are established in what is known as GMP. Products that are produced in GMP conditions have insured traceability, safety and reproducibility of the protocols employed. The application of these measures is particularly difficult when the source material is of cellular origin as obtaining a sample from a patient as source of cell to reprogram and the procedure in place in *in vitro* fertilization (IVF) labs from where the pre-embryos used to derive hESC lines are not compliant with GMP. The rules of safety and quality in obtaining, processing and use of the cell samples or tissues are regulated by the *Real Decreto* 1301/2006 of the *Ministerio de Sanitat y Consumo del Gobierno Español*, and the Regulation (CE) # 1394/2007 of the European Parliament over advanced therapy drugs. This legislation establishes strict conditions for the application of pluripotent cells in clinical therapies, rules which, sometimes, can be difficult to maintain.

In order to apply a cell product derived from pluripotent cells, it is necessary that all procedures of reprogramming or derivation up to the terminal cell differentiation have been carried out in controlled conditions. This imply not only the use of reproducible protocols and a specific workflow, but also that all the growth factors, reagents, culture media, cell lines, etc. that are used are clinical grade approved or GMP. In many cases the product used come from animal sources such as FBS or the MEF and, although it is clear that they can present a great variability among lots, they can also obtain a clinical grade approval or GMP if their use is indispensable to produce the final product. However, it is especially recommended the substitution of these products with their equivalents that are free from xenobiotics, being them recombinant or of human origin. These products allow for a higher level of standardization of the process, make it easier to detect pathogens, avoid the possible transfer of unknown animal pathogens and reduce the risk of immunological rejection of the animal protein once the cells are transplanted in a patient.

In the case of hESC, the pre-embryos that are used to derive hESC lines are donated by patients that have undergone IVF cycles in assisted reproduction centers. The activity of these centers is regulated by the *Real Decreto* 1301/2006 and for this reason they comply to the legislative framework regulating the clinical grade biological material. The process of hESC line derivation has traditionally used immunosurgery to isolate the ICM and of pronase to eliminate the ZP, which imply the use of antibodies and other protein of animal source. It is important to substitute these products for the clinical application of hESC. Actually, there are already protocols for the derivation, culture and preservation of hESC that fall under the clinical grade category (Crook et al., 2007), in which the authors used products of animal origin which comply with the GMP requirements. However, these protocols can be improved with the use of recombinant or xeno-free products. Also, researchers have described protocols for the derivation and differentiation of hESC to population of clinical interest such as neuron stem cells or dopaminergic neurons in conditions that are strictly xenofree and transferable to GMP conditions (Swistowski et al., 2009).

The reprogramming of somatic cells to hiPSC is a complex process, and the approval for its use in clinical therapy requires firstly the development of safe reprogramming strategies as well as culture methods that use substances recombinant or free from xenobiotics. The elaboration of protocols that are free from products of animal origin from the collection of the sample to the complete reprogramming of the cell colonies is a first step that is critical in order to bring these cells closer to future cell therapies in regenerative medicine (described in paper 5). At the same time, it is very important to develop a reprogramming method which does not imply the integration of exogenous genetic material in the somatic cell and that at the same time would give rise to a completely reprogrammed cell, up to the stage of pluripotent cell (described in paper 8). Once the pluripotent cell lines have been obtained, it is necessary to establish protocols for their culture, cryopreservation and differentiation which comply with the conditions of reproducibility that are expected by the clinical grade category.

03.

INTRODUCCIÓ

3.1 INTRODUCCIÓ GENERAL

Amb la unió de l'espermatozoide i de l'òocit comença tot un procés que portarà una única cèl·lula a desenvolupar un nou organisme complex i únic. La cèl·lula producte d'aquesta fusió s'anomena zigot i és l'essència del que entenem per cèl·lula totipotent. El zigot té la capacitat de formar qualsevol tipus cel·lular de l'organisme i no només això, també té la capacitat de dirigir l'organització d'aquestes poblacions cel·lulars en teixits funcionals, aquests teixits en òrgans i els òrgans en un individu sempre i quan es desenvolupi en un ambient propici com és, en animals placentaris, l'úter matern.

El zigot és portador de tota la informació genètica i epigenètica necessària perquè es pugui dur a terme aquest procés de desenvolupament embrionari. La informació genètica del zigot és la suma del material genètic dels gàmetes matern i patern. Però no és només la informació que aporten aquests gàmetes la que permet un desenvolupament correcte, sinó també l'estat d'activació i desactivació de tots els gens que conformen el seu genoma (el que es coneix com estatus epigenètic) cosa que permet una correcta expressió gènica perquè tot el procés pugui transcorre adientment.

Una vegada produïda la fecundació, el zigot comença un procés de divisió cel·lular que fa que en un període de 3 dies l'embrió passi a estar format per 8 cèl·lules (conegudes com blastòmers) en el cas de l'espècie humana. Arribades a aquest punt, les cèl·lules comencen el procés de compactació en el qual es perdrà la definició entre les cèl·lules i a continuació es formarà el blastocist, en que, per primera vegada s'establiran dues poblacions cel·lulars diferenciades. Per una banda, les cèl·lules que quedin a l'exterior establiran unes unions intercel·lulars fortes entre elles i estaran destinades a formar el que es coneix com trofocoderm, del qual derivarà la part embrionària de la placenta. Per l'altra banda, les cèl·lules que quedin a l'interior de l'embrió establiran unions més febles que permetran la reorganització cel·lular en el futur i són les cèl·lules que formaran el que es coneix com la massa cel·lular interna (ICM). Les cèl·lules de la ICM són les que formaran tots els tipus cel·lulars que donaran lloc al fetus.

3.2 TIPUS DE POTENCIALITAT CEL·LULAR

3.2.1 CÈL·LULES TOTIPOTENTS

Són aquelles que formen part de l'embrió des del moment de la fecundació fins a l'estadi de 8 cèl·lules previ a la compactació. Aquestes cèl·lules tenen la capacitat de formar qualsevol tipus cel·lular tant del fetus com de les membranes extraembrionàries. La capacitat totipotent d'aquestes cèl·lules està demostrada pel fet que cada un dels blastòmers té la capacitat de formar un nou individu complet si se separen i es gesten individualment (Moore et al., 1968; Rossant, 1976; Tarkowski and Wroblewska, 1967). De fet aquest és un mètode que ha estat utilitzat per clonació reproductiva en recerca i en producció animal.

3.2.2 CÈL·LULES PLURIPOTENTS

Són aquelles cèl·lules que tenen la capacitat de formar qualsevol tipus cel·lular de l'organisme adult. Hi ha cinc tipus de cèl·lules pluripotents:

3.2.2.1 Cèl·lules de la massa cel·lular interna

Aquestes cèl·lules són les que es troben al interior del blastocel l'embrió de 5-7 dies en el cas del humà. Durant el desenvolupament embrionari aquestes cèl·lules es diferenciarien en un primer moment per formar per una banda l'endoderm primitiu, que donarà lloc a estructures extraembrionàries, i per l'altra banda l'epiblast, del qual derivaran els tres teixits germinals primordials de l'embrió: endoderm, ectoderm i mesoderm. A partir d'aquets tres tipus tissulars es desenvoluparan la resta de teixits de l'organisme.

3.2.2.2 Cèl·lules mare embrionàries

Són les cèl·lules que es deriven a partir de l'embrió i que es poden mantenir en cultiu *in vitro* de forma indefinida (figura 1). Com a característiques principals, les cèl·lules mare embrionàries (ESC) conserven la pluripotencialitat de les cèl·lules de la ICM i a més adquireixen capacitat d'autorenovació en les condicions de cultiu adients. Aquestes cèl·lules varen ser descrites per primera vegada en ratolí al 1981 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981), però no va ser fins el 1998 quan es va derivar la primera línia d'ESC humanes (hESC) (Thomson et al., 1998). S'obtenen primordialment a partir de blastocists però s'han descrit també protocols que utilitzen estadis mes primerencs, com la mòrula o cèl·lules úniques. (Ampliat a la secció 3.3).

3.2.2.3 Cèl·lules de pluripotència induïda

L'any 2007 el grup de Shinya Yamanaka va descriure el procés de reprogramació cel·lular a través del qual una cèl·lula somàtica podia ser reprogramada fins a l'estadi de cèl·lula pluripotent (Takahashi et al., 2007). Les cèl·lules de pluripotència induïda (iPSC) són cèl·lules pluripotents amb capacitat d'autorenovació que han estat produïdes al laboratori per reprogramació induïda de cèl·lules somàtiques mitjançant la sobreexpressió d'un nombre de factors definits. Aquest procés es coneix amb el nom de reprogramació cel·lular i a priori totes les cèl·lules de l'organisme són susceptibles de ser reprogramades. (Ampliat a la secció 3.4).

3.2.2.4 Cèl·lules germinals primordials:

Les cèl·lules germinals primordials (PGC) es troben a la cresta germinal de l'embrió i són les precursoras dels gàmetes masculins i femenins. Aquestes cèl·lules es generen extraembrionàriament

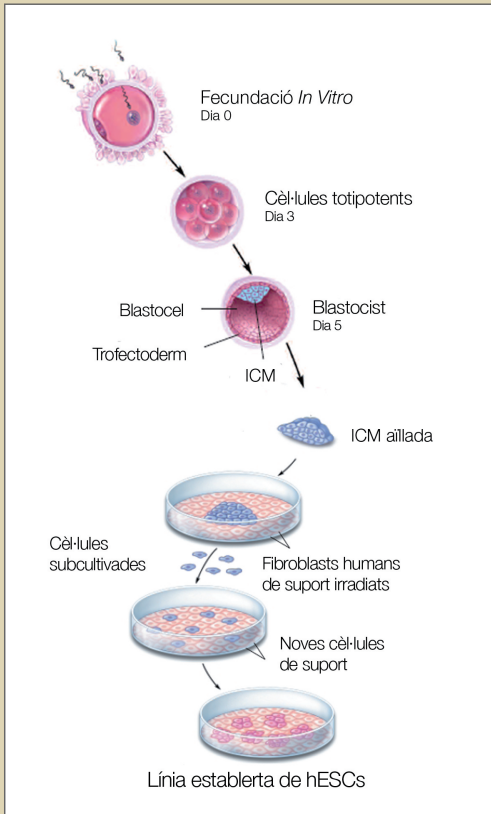


Figura 1

Procés de derivació d'una línia de cèl·lules mare embrionàries humanes (hESC) a partir de la massa cel·lular interna (ICM) d'un embrió de 5 dies post-fecundació. Una vegada aïllada la ICM es co-cultiva sobre una monocapa de cèl·lules de suport irradiades. Les hESC es poden mantenir en cultiu indefinidament, tot i mantenint el seu estat indiferenciat i capacitat pluripotent, sempre que es facin servir condicions de cultiu adients. (Modificat de <http://stemcells.nih.gov/>).

i es divideixen per mitosi durant la seva migració per l'al·lantoide fins a l'embrió. Una vegada que arriben a les crestes germinals, les PGC del fetus femení entren en meiosi i donaran lloc als oòcits; al fetus masculí mantenen el seu potencial mitòtic i entraran en meiosi domes després del naixement per formar els espermatozoides quan l'individu arribi a la pubertat. La unió de l'oòcit i de l'espermatozoide donarà lloc al zigot. Les PGC durant la seva migració adquireixen un *imprinting* epigenètic el qual és necessari per dur a terme un desenvolupament embrionari correcte per arribar a formar un nou individu. Una vegada aïllades i cultivades *in vitro*, les PGC poden donar lloc espontàniament a les cèl·lules mare germinals, les quals tenen les mateixes capacitats de pluripotència que les ESC. És per aquesta raó que les PGC són considerades cèl·lules pluripotents (Shamblott et al., 2001; Shamblott et al., 1998).

3.2.2.5 Cèl·lules mare espermatoogòniques

Les cèl·lules mare espermatoogòniques (SSC) són les cèl·lules encarregades de mantenir la població d'espermatoogònies al testicle durant tota la vida de l'individu, preservant-ne així la fertilitat. L'any 2008 el grup del Thomas Skutella va descriure per primera vegada el cultiu estable *in vitro* de les

SSC humanes i les seves propietats (Conrad et al., 2008). Aquestes cèl·lules presentaven característiques molt similars al de les hESC pel que fa als marcadors que expressaven i a la capacitat de diferenciació. Així aquestes cèl·lules es consideren pluripotents ja que es poden diferenciar *in vitro* a teixits de les tres capes germinals i tenen la capacitat de formar teratomes una vegada són injectades en ratolins immunodeficients.

3.2.3 Cèl·lules multipotents

Aquestes cèl·lules, també conegudes com a cèl·lules mare adultes (ASC), es troben tant al fetus com a l'organisme adult, són específiques de teixit i estan en un estadi de diferenciació més o menys avançat en funció del teixit de procedència. Algunes ASC són les responsables del manteniment i la regeneració dels teixits on es troben durant tota la vida de l'individu i per tant es consideren cèl·lules amb capacitat d'autorenovació.

Les ASC es troben a la majoria de teixits adults tals com la medul·la òssia, la pell, àrees específiques del sistema nerviós central, el greix, l'epiteli intestinal, etc. Les ASC que més es coneixen i que es fan servir de forma rutinària en teràpies de substitució cel·lular són les cèl·lules mare hematopoètiques (HSC). Les HSC es troben tant al moll d'os com a la sang de cordó, tenen una alta capacitat d'autorenovació *in vivo* i són el reservori cel·lular per la formació de tots els derivats hematopoètics (Weissman and Shizuru, 2008). Aquestes cèl·lules s'han utilitzat des de l'any 1989 per tractar problemes hematològics com diversos tipus de leucèmies o anèmies (Gluckman et al., 1989). En el cas de la pell, una de les teories més recents exposa que hi ha un únic tipus de progenitor epidèrmic que es capaç de mantenir l'homeostasi de tot el teixit (Clayton et al., 2007). També s'ha vist com l'epidermis, els fol·licles pilosos i les glàndules sebàcies presenten poblacions de cèl·lules progenitores específiques però en un cert moment aquestes poblacions poden migrar per reparar algun dels altres dos teixits si la seva població progenitora s'ha perdut (Fuchs and Horsley, 2008). També s'ha demostrat l'existència de cèl·lules mare neurals adultes amb capacitat d'autorenovació i de diferenciació cap a la formació de neurones madures. Només hi ha dos regions al cervell humà on s'ha demostrat l'existència de cèl·lules mare neurals: a la zona subventricular del ventricle lateral i a la zona subgranular del *gyrus dentatus* de l'hipocamp (Gage, 2000; Jessberger et al., 2008).

Les ASC estan compromeses amb una diferenciació terminal específica encara que algunes com ara les cèl·lules mare mesenquimals (MSC) tenen certa plasticitat a l'hora de diferenciar-se a diferents tipus de teixits, no només del llinatge mesodèrmic com osteoblasts, condrocits o adipòcits, sinó també altres poblacions d'origen ectodèrmic com neurones i astròcits (Meirelles Lda and Nardi, 2009). S'ha demostrat la presència de MSC en l'estroma de molts òrgans de l'organisme on contribueixen a l'homeòstasi del teixit (da Silva Meirelles et al., 2006).

En un principi es va creure que les ASC no estaven del tot compromeses amb els teixits dels quals formaven part i que per tant seria fàcil la transdiferenciació (formar un tipus cel·lular diferent al que està establert a la seva ruta de diferenciació) a altres teixits on s'hagués perdut la funció. A més

l'ús d'aquestes cèl·lules no comportava cap debat ètic ja que són cèl·lules adultes que provenen del propi pacient i no cal utilitzar embrions per tal d'obtenir-les. El principal problema que presenten és la dificultat per mantenir-les en cultiu *in vitro* en el seu estatus multipotent i és per aquesta raó que la majoria de procediments clínics que utilitzen les ASC per teràpia fan un ús intraquirúrgic amb o sense criopreservació de les poblacions enriquides amb ASC com succeeix amb les MSC o amb les HSC. En el cas de les MSC s'ha vist que la seva potencialitat terapèutica no és causada per una repoblació i/o transdiferenciació en el teixit diana de les cèl·lules d'interès, sinó a la seva capacitat de secretar molècules bioactives amb propietats immunomoduladores, angiogèniques, anti-apoptòtiques i quimiotàctiques (Abdi et al., 2008; Nauta and Fibbe, 2007).

3.3 CÈL·LULES MARE EMBRIONÀRIES

Des que es va descriure per primera vegada l'aïllament i el manteniment del cultiu *in vitro* de les ESC de ratolí (mESC) l'any 1981 (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981) aquestes es varen convertir en una promesa de futur pel camp de la medicina regenerativa, la teràpia cel·lular i la biotecnologia.

Poc després es va demostrar l'estatus de pluripotència d'aquestes cèl·lules al comprovar la seva capacitat de formar individus quimèrics viables amb contribució a tots els teixits inclosa la línia germinal una vegada injectades a blastocists de ratolí. Les mESC varen esdevenir una eina fonamental als laboratoris de biotecnologia al facilitar la seva manipulació genètica *in vitro* per tal de donar lloc a ratolins transgènic a mida per una finalitat concreta. Això permet posar a punt models animals per malalties humanes i serveix com a eina per entendre nous mecanismes de la biologia molecular.

No va ser fins l'any 1998 quan es van derivar les primeres línies de hESC per part del grup de James Thomson (Thomson et al., 1998). Aquestes primeres derivacions varen servir per definir els criteris que havien de complir les hESC per ser considerades com a tals: 1) Les cèl·lules havien de ser derivades a partir d'un embrió pre-implantacional, 2) les cèl·lules havien de demostrar la capacitat de mantenir-se indiferenciades en cultiu *in vitro*, 3) les cèl·lules havien de demostrar un potencial estable de desenvolupament després de períodes prolongats en cultiu mitjançant la seva capacitat de formar teixits derivats de les tres capes germinals.

Les següents derivacions es varen dur a terme per el grup de Benjamin Reubinoff (Reubinoff et al., 2000) l'any 2000, confirmant així els resultats obtinguts als primers experiments. En el cas de les hESC, la pluripotència d'aquestes cèl·lules no es pot demostrar amb la formació d'individus quimèrics ja que suposaria un assaig intolerable des del punt de vista ètic. Per aquesta raó, la pluripotencialitat de les hESC s'ha demostrat tradicionalment mitjançant protocols de diferenciació *in vitro* cap a múltiples teixits de tots els orígens germinals així com la capacitat *in vivo* d'aquestes cèl·lules per induir teratomes formats per estructures tissular ordenades i ben organitzades

procedents de les tres capes germinals una vegada injectades en ratolins immunodeficients.

El potencial de diferenciació de les hESC va revolucionar el camp de la teràpia cel·lular i de la medicina regenerativa. Actualment hi ha nombrosos laboratoris al món que han utilitzat pre-embrions preimplantacionals per la derivació de hESC amb diferents metodologies de derivació (ampliat a la secció 3.3.2). Els pre-embrions que s'utilitzen per la derivació procedeixen de programes de reproducció assistida i es tracta de pre-embrions donats per recerca per les parelles quan ja no tenen projecte parental. Aquesta és una de les opcions possibles en determinades legislacions com la de l'Estat Espanyol. Un altre font per l'obtenció de hESC són els pre-embrions anormals procedents dels programes de diagnòstic genètic preimplantacional (PGD), descartats després de seleccionar els pre-embrions normals en parelles amb elevat risc genètic.

3.3.1 IMPORTÀNCIA BIOMÈDICA DE LES hESC

Com ja s'ha comentat, una de les principals característiques de les hESC és que tenen la capacitat teòrica per formar *in vitro* qualsevol tipus cel·lular de l'organisme. És aquesta capacitat la que ha centrat gran part del interès del grups de recerca amb hESC i el principal objectiu ha estat entendre els mecanismes que determinen la diferenciació específica de les ESC i com poder controlar aquest procés *in vitro*. Quan això sigui possible es podrà pensar en aplicar la teràpia amb hESC de forma segura per tractar o pal·liar malalties produïdes per una pèrdua de funció cel·lular. (Ampliat a la secció 3.5).

Les hESC són una eina complementària als models animals que existeixen per entendre quins són els factors que determinen com les cèl·lules pluripotents es comprometen amb una línia germinal determinada en el procés de la diferenciació així com els mecanismes moleculars que controlen el desenvolupament embrionari de l'ésser humà en les primeres fases (Dvash et al., 2006). També permeten entendre quines són les seqüències en l'expressió de gens clau durant la diferenciació cel·lular fins a poblacions madures amb un alt grau d'especialització (Clark and Reijo Pera, 2006; Meyer et al., 2009) generant així un model *in vitro* de desenvolupament embrionari fins l'estadi neonatal (figura 2).

Les línies de hESC específiques de malalties obtingudes a partir d'embrions descartats de processos de PGD, tals com la fibrosis quística (Pickering et al., 2005), la malaltia de Huntington (Mateizel et al., 2006) i la síndrome de l'X fràgil (Eiges et al., 2007), són una valuosa eina en l'estudi d'aquestes malalties. A més, la capacitat de modificar genèticament les línies normals permet fer servir aquestes cèl·lules com a model de moltes malalties amb una base genètica coneguda. Per exemple, Urbach et al. fent servir la malaltia de Lesch-Nyhan com a model va aconseguir crear una línia transgènica de hESC que anul·lava l'activitat del gen *hprt1* mitjançant recombinació homòloga (Urbach et al., 2004). Així doncs una vegada generada una línia transgènica o a través de la línia de hESC obtinguda a partir d'un embrió afectat, es poden investigar els mecanismes

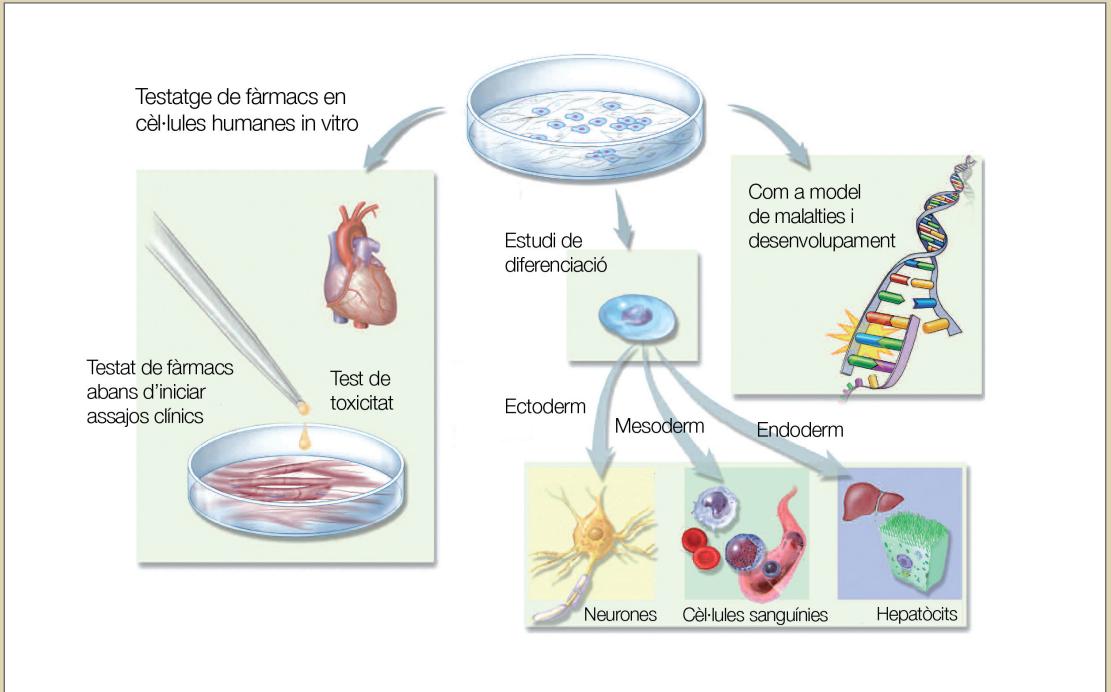


Figura 2

Possibles aplicacions de les línies de hESC. Les hESC serveixen com a model humà *in vitro* per testar la toxicitat i funcionalitat de nous fàrmac i productes químics. També permeten fer estudis de diferenciació per investigar els mecanismes que regulen la diferenciació de cèl·lules humanes, així com per establir els protocols que permetran obtenir poblacions cel·lulars amb futures aplicacions clíniques. Les hESC també són una bona eina per establir models de malalties i de desenvolupament. (Modificat de <http://stemcells.nih.gov/>).

que impedeixen un desenvolupament correcte cap a un tipus cel·lular determinat o bé quin és el mecanisme que impedeix el correcte funcionament d'aquella població (Abdul Kadir et al., 2009; Catalina et al., 2009; Saha and Jaenisch, 2009). Per tal de poder fer servir aquestes cèl·lules com a model de malaltia s'han hagut de desenvolupar protocols de diferenciació cap als tipus cel·lulars que ens permeten estudiar la malaltia en qüestió (figura 2).

La capacitat de diferenciació de les hESC permet obtenir poblacions cel·lulars diferenciades que poden establir models *in vitro* de malalties com la malaltia de Parkinson, la diabetis o l'infart de miocardi. És per aquest motiu que molts grups de recerca han treballat en l'establiment de protocols de diferenciació de les hESC cap a tipus cel·lulars específics de l'organisme. L'any 2001 Assady et al. (Assady et al., 2001) va aconseguir diferenciar hESC a cèl·lules pancreàtiques secretores d'insulina. Des d'aquell moment molts altres grups han desenvolupat nous protocols que optimitzen l'obtenció de derivats pancreàtics a partir de hESC en termes d'eficiència i funcionalitat (Liew et al., 2008; Phillips et al., 2007). Altres protocols de diferenciació han estat descrits, com per exemple la diferenciació espontània cap a cardiomiòcits (Kehat et al., 2001) i com aquestes cèl·lules presentaven a més una funcionalitat fisiològica (Satin et al., 2004). També s'ha fet un gran esforç en trobar protocols eficients per l'obtenció de precursors hematopoètics que puguin substituir les teràpies tradicionals amb moll d'os o sang de cordó (Kaufman et al., 2001; Ledran et al., 2008). Un altre camp molt estès és el de diferenciació de cèl·lules pluripotents cap a precursors neurals (Itskovitz-Eldor et al., 2000) especialment a precursors dopaminèrgics per pal·liar els efectes de la malaltia de Parkinson (Ko et al., 2009; Zhang and Zhang). Malgrat que es tracta d'un camp d'investigació en progrés constant, encara no s'han trobat les condicions òptimes i definides per a la diferenciació a tipus cel·lulars funcionals en la majoria dels casos.

Les hESC són també una eina amb gran potencialitat per les empreses farmacèutiques a l'hora de testar nous fàrmacs a gran escala (figura 2). En aquest sentit les hESC tenen dos avantatges fonamentals. En primer lloc són un millor model *in vitro* que les mESC per valorar la toxicitat en humans de noves molècules i disminueix per tant la utilització d'animals d'experimentació, amb un gran estalvi econòmic i ètic (Krtolica et al., 2009). A més la seva capacitat de diferenciació a qualsevol teixit fa de les hESC una font molt valuosa de cèl·lules funcionals difícils d'obtenir per mètodes habituals (com ara els cardiomiòcits humans) (Steel et al., 2009) i que permeten comprovar tant la toxicitat com la funcionalitat de noves molècules candidates sobre el teixit d'interès que s'ha diferenciat.

3.3.2 DERIVACIÓ

En l'actualitat al voltant de 600 línies de hESC han estat derivades i registrades al món segons el Registre Europeu de hESC (www.hescereg.eu, Borstlap et al., 2008).

El procés de derivació consisteix en aconseguir aïllar les cèl·lules que formen part de la ICM per aconseguir una població pura de hESC i mantenir aquestes cèl·lules en cultiu en el seu estat pluripotent d'una forma indefinida (figura 1). Aquestes cèl·lules s'han obtingut tradicionalment a partir de pre-embrions supernumeraris procedents de centres de reproducció assistida i donats a la recerca per les parelles que ja havien satisfet les seves necessitat reproductives.

Els protocols utilitzats per aquestes derivacions són quasi tan heterogenis com els grups de recerca que les han obtingut, ja que no existeix un consens en l'optimització del protocol per la derivació de les hESC. Segons l'estadi de desenvolupament embrionari podem classificar les

estratègies de derivació en tres categories: derivació a partir de la ICM del blastocist, derivació a partir de l'embrió en estat de mòrula compactada i derivació a partir d'un únic blastòmer (figura 3).

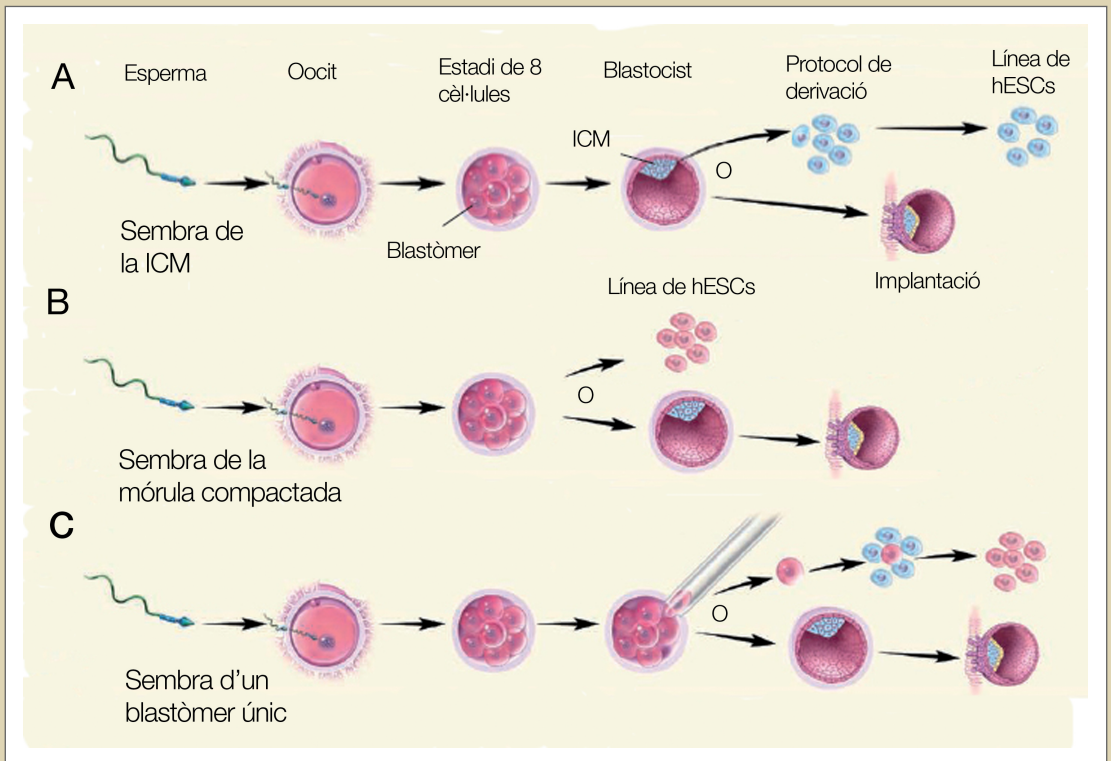


Figura 3

Mètodes de derivació de hESC segons l'estadi de desenvolupament embrionari. A, derivació a partir de la ICM del blastocist els dies 5-10 post-fecundació. B, derivació a partir de l'embrió en estat de mòrula el dia 4 post-fecundació. C, derivació a partir d'un únic blastòmer per biòpsia embrionària el dia 3 post-fecundació. (Modificat de <http://stemcells.nih.gov/>).

3.3.2.1 Derivació a partir de la massa cel·lular interna del blastocist

Aquest és el mètode més habitual per la derivació de les hESC (Thomson et al., 1998; Reubinoff et al., 2000). L'embrió és cultivat fins al dia 5-9 post-fecundació, quan arriba al estadi de blastocist. Són les cèl·lules de la ICM les que donaran lloc a les hESC en determinades condicions de cultiu *in vitro* (figura 3A). En aquest punt s'ha d'intentar separar la ICM del trofectoderm ja que aquest podria dificultar la proliferació i la viabilitat en el creixement inicial de les hESC. Aquest és el mètode que hem fet servir per les derivacions en els papers 1 i 2. Segons el mètode utilitzat per l'aïllament de la ICM es pot classificar la metodologia en tres categories: sembra sencera del blastocist, aïllament de la ICM per immunocirurgia o aïllament físic de la ICM. En tots els mètodes, es requereix l'eliminació de la zona pel·lúcida (ZP) abans de la sembra amb una estratègia enzimàtica amb pronasa o bé químicament amb una solució d'àcid Tyrodes.

L'estratègia més simple és la sembra sencera del blastocist. Aquesta estratègia es fa servir quan la ICM no es diferencia clarament del trofectoderm o bé si no es disposa de la tecnologia necessària per la dissecció de la ICM. Aquest mètode té l'avantatge de ser el més senzill de tots ja que no requereix de cap micromanipulació de l'embrió. No obstant això, té l'inconvenient de ser el mètode que menys proporció de trofectoderm aconseguen eliminar en relació a la ICM i per tant el que té menys possibilitats d'èxit.

Una estratègia més sofisticada és l'aïllament de la ICM per immunocirurgia (Solter and Knowles, 1975). Amb aquesta estratègia es pretén eliminar el màxim de trofectoderm possible deixant les cèl·lules de la ICM intactes. Aquest sistema només es pot fer servir si el trofectoderm del blastocist està intacte i per tant la ICM es troba confinada a l'interior del blastocel ja que els anticossos i el complement també reconeixen les cèl·lules de la ICM i les destruirien tal i com fan amb el trofectoderm.

L'aïllament físic de la ICM és una bona opció per l'eliminació del trofectoderm i incrementar així les probabilitats d'èxit. Actualment s'han descrit dues estratègies per l'aïllament físic de la ICM sense fer servir cap estratègia enzimàtica, immunològica o química. Una primera estratègia és l'aïllament mecànic de la ICM, que consisteix en la dissecció de la ICM amb agulles primes de tal manera que s'aconsegueix tallar la porció de l'embrió on es troba la ICM (Strom et al., 2007). Té el problema que es difícil evitar la contaminació amb cèl·lules del trofectoderm ja que aquestes estan íntimament adherides a la ICM per la part exterior. L'altre estratègia física consisteix en l'aïllament assistit amb làser, lesionant les cèl·lules del trofectoderm de tal manera que es redueix la viabilitat. Si la localització de la ICM es molt clara, es pot arribar a seccionar gran part del trofectoderm oposat a la ICM. També es difícil eliminar tot el trofectoderm però permet lesionar gran part de les seves cèl·lules (Turetsky et al., 2008; Cortes et al., 2008). Aquest mètode ha estat abordat al paper 2.

3.3.2.2 Derivació a partir de l'embrió en estat de mòrula compactada

La derivació de línies de hESC a partir de pre-embrió en l'estadi de mòrula va ser descrit l'any 2004 per Strelchenko et al. (Strelchenko et al., 2004). Aquesta tècnica consisteix en la sembra de l'embrió sencer quan aquest arriba a l'estadi de mòrula compactada (figura 3B). Les cèl·lules que componen la mòrula compactada són totipotents ja que encara no han format cap estructura diferenciada, i per tant una vegada sembrat per a la derivació, el pre-embrió pot donar lloc tant a cèl·lules del trofotoderm com a cèl·lules de la ICM abans d'estabilitzar el cultiu, cosa que pot comprometre l'èxit de l'estratègia.

3.3.2.3 Derivació a partir d'un únic blastòmer

Aquesta estratègia, descrita pel grup de Robert Lanza (Chung et al., 2008; Klimanskaya et al., 2006), té l'avantatge que no implica la destrucció de l'embrió a partir de què es vol derivar la línia de hESC, superant així el problema ètic que suposa la destrucció de pre-embrió humans pel seu ús en recerca. Per portar a terme aquesta estratègia, s'ha de realitzar una biòpsia embrionària com si es tractés d'un diagnòstic pre-implantacional per la obtenció d'un únic blastòmer a partir d'un embrió en estadi de mòrula no compactada (figura 3C). En el primer experiment referit (Klimanskaya et al., 2006), aquesta única cèl·lula es co-cultiva durant uns dies en les mateixes plaques que línies ja establertes de hESC que proporcionen un ambient òptim pel seu creixement. En el segon experiment (Chung et al., 2008), l'optimització de la tècnica permet la derivació sense la presència de hESC i es preserva l'embrió a partir del qual s'ha fet la biòpsia que es podria fer servir en el procés habitual dels cicles de reproducció assistida amb una finalitat reproductiva. En el cas que tant la derivació com la gestació tinguessin èxit, l'individu que naixes disposaria d'una línia de hESC amb el seu mateix perfil genètic.

3.3.3 MÈTODES DE CULTIU

Hi ha hagut molts recursos dedicats per part dels grups de recerca i de les companyies de biotecnologia per a l'optimització dels mètodes de cultiu per les hESC. L'evolució d'aquests mètodes ha tendit a desenvolupar medis cada vegada més definits per poder controlar els factors que permeten el manteniment de la pluripotencialitat i per identificar aquells que permetrien una diferenciació dirigida. També hi ha hagut una tendència clara cap a l'eliminació dels derivats dels sèrums animals i en definitiva de tots aquells reactius que comporten una contaminació amb xeno-derivats.

Les hESC tenen una capacitat natural per continuar en el seu procés de desenvolupament embrionari d'origen i per tant una forta tendència a iniciar una diferenciació espontània cap a les tres capes germinals primordials. Així, la clau dels mètodes desenvolupats per cultivar les hESC

és aconseguir mantenir indefinidament el seu cultiu en condicions indiferenciades. Des de les primeres derivacions, els medis de cultiu han anat millorant la seva capacitat per mantenir un cultiu estable de les hESC. L'any 2000 es va descriure com el *basic-fibroblast growth factor* (b-FGF també conegut com FGF-2) mantenia el cultiu indiferenciat de les hESC i al mateix temps millorava l'eficiència de clonatge (Amit et al., 2000). A partir d'aquest punt el b-FGF es va convertir en un factor de creixement essencial a tots els medis destinats a mantenir un cultiu estable de hESC.

En els últims anys s'han descrit diverses condicions de cultiu que mantenen un cultiu estable de les hESC. A continuació es resumeixen els principals mètodes de cultiu existents:

3.3.3.1 Substrats per al cultiu de les hESC

El mètode clàssic de cultiu implica la utilització de cèl·lules que donen suport físic i paracrí per al creixement de les hESC. Les cèl·lules de suport aporten factors de creixement fonamentals per al manteniment de la pluripotència de les línies de hESC (Chin et al., 2007). Quan es co-cultiven les hESC amb cèl·lules de suport, les colònies que es formen tendeixen a ser compactes amb una textura esponjosa, creixen més en volum i no es troben tan íntimament unides al substrat de la placa. Això permet un subcultiu mecànic de les colònies amb eines específiques que permeten la formació de petits agregats cel·lulars evitant així l'ús de mètodes enzimàtics. Aquesta estratègia mecànica minimitza l'aparició d'anomalies cromosòmiques que poden aparèixer durant el cultiu prolongat ja que aquest mètode suavitza la pressió de selecció sobre les cèl·lules en comparació amb els mètodes enzimàtics (Draper et al., 2004; Spits et al., 2008).

S'han descrits molts tipus cel·lulars que tenen la capacitat de mantenir el cultiu de les hESC, fent de cèl·lules de suport. Les primeres derivacions de hESC es van aconseguir mitjançant el co-cultiu dels pre-embrions humans sobre una capa de fibroblasts embrionaris de ratolí (MEF) mitòticament inactivats (Thomson et al., 1998). Es va veure que els factors secretats per les MEF durant el co-cultiu amb les hESC eren fonamentals pel manteniment de la seva pluripotència. Més endavant es va demostrar que fibroblasts humans procedents de biòpsies de prepuci (HFF) mitòticament inactivats també permetien mantenir un cultiu estable de les hESC (Hovatta et al., 2003). D'aquesta manera es va aconseguir evitar dependre de cèl·lules d'origen animal eliminant un dels xenocontaminants més habituals en el cultiu de les hESC. Aquest és el mètode que hem fet servir al *paper 1 i 2*. Poc després es va descriure el co-cultiu amb fibroblasts autogènics (és a dir, derivats de les pròpies hESC) el qual va suposar un pas important en l'eliminació de component al·logènics en el cultiu de hESC. Aquesta metodologia consisteix en diferenciar fibroblasts a partir de hESC que es fan servir com a font de cèl·lules de suport per a les mateixes hESC de les que procedeixen (Choo et al., 2008; Stojkovic et al., 2005; Wang et al., 2005). D'aquesta manera s'evita la contaminació amb altres fonts genètiques que no siguin la de la pròpia línia de hESC i s'elimina el risc de transmissió de patògens a partir de la mostra del donant de fibroblasts. S'han descrit altres tipus cel·lulars que tenen la capacitat de mantenir el cultiu de les hESC, com ara els fibroblasts fetals de pulmó humà (Chavez et al., 2008), cèl·lules fusiformes

diferenciades a partir de cèl·lules de cordó umbilical (Zhan et al., 2008), cèl·lules mare mesenquimals (Choo et al., 2008), cèl·lules de l'endometri uterí (Lee et al., 2005) i cèl·lules de l'estroma hepàtic fetal humà (Ji et al., 2009). Els factors i els mecanismes d'acció d'aquestes cèl·lules continuen essent, en gran part, desconeguts.

Una alternativa al co-cultiu amb cèl·lules de suport és el cultiu sobre matrius proteiques. El cultiu de les hESC lliure de cèl·lules de suport és actualment un mètode molt estès i que presenta clars avantatges i inconvenients. L'avantatge principal és que permet cultivar les hESC sense contaminació amb altres cèl·lules, i per tant permet la recollida de mostres cel·lulars per qualsevol tipus de test bioquímic que requereix una població pura (per exemple: tests quantitius i qualitius d'expressió gènica, anàlisis de metilació de promotors, *southern blots*, extracció i anàlisis de proteïnes, etc.). La contaminació amb altres fonts cel·lulars també suposa un problema de cara a una possible aplicació terapèutica de les hESC ja que pot augmentar el rebuig immunològic si la mostra es contamina amb aquesta segona font cel·lular. Aquest mètode també permet una expansió enzimàtica més ràpida i eficient. Per últim l'ús de matrius proteiques permet mantenir el cultiu en condicions més definides i controlades ja que els factors que secreten les cèl·lules de suport no estan completament descrits. Un dels inconvenients del cultiu sobre matrius proteiques es que el fet d'utilitzar un subcultiu enzimàtic sotmet a les línies a una major pressió de selecció. Hi ha estudis que demostren que els mètodes enzimàtics de subcultiu augmenten el risc de que les línies de hESC adquireixin anomalies cromosòmiques tals com trisomies del cromosoma 12 i 17 les quals incrementen la seva capacitat de propagació *in vitro* (Draper et al., 2004). Així doncs, per tal de controlar l'estabilitat cromosòmica de les línies de hESC és important realitzar periòdicament un cariotip, especialment si el mètode de subcultiu és enzimàtic.

Hi ha descrits diferents tipus de matrius proteiques que són capaces de mantenir el cultiu estable de les hESC. Aquí les hem classificat en dos grups segons la puresa de la seva composició. En primer lloc tenim les matrius proteiques de composició complexa on el principal component d'aquest grup és el Matrigel. El Matrigel és una matriu extracel·lular secretada per les cèl·lules d'un tumor d'origen murí i la seva composició és complexa i no del tot definida (Xu et al., 2001). També s'ha fet servir la matriu extracel·lular secretada per les MEF com a substrat per la derivació i el manteniment de les hESC (Klimanskaya et al., 2005). Existeixen també les matrius proteiques de composició definida basades en la capacitat de determinades proteïnes de la matriu extracel·lular per donar suport a la derivació i al cultiu de les hESC sense la necessitat de cèl·lules de suport. L'any 2001 ja es va descriure que la laminina per ella mateixa era capaç de mantenir el cultiu indiferenciat de les hESC (Li et al., 2005; Xu et al., 2001). Ludwig et al. va descriure l'any 2006 com una barreja definida de col·lagen IV, laminina, fibronectina i vitronectina era capaç de permetre la derivació i el manteniment de les hESC (Ludwig et al., 2006). També s'ha vist que la fibronectina per ella mateixa o en combinació amb el col·lagen IV es capaç de mantenir un cultiu estable de hESC (Lu et al., 2006). Recentment s'ha descrit que la vitronectina humana recombinant, matriu altament purificada i definida, dona suport al cultiu de les línies de hESC (Braam et al., 2008).

3.3.3.2 Medis de cultiu per les hESC

En les primeres derivacions descrites de línies de hESC es van fer servir medis de cultiu suplementats amb sèrum fetal boví (FBS). Ràpidament es va comprovar que a causa de la seva riquesa en factors de creixement, el FBS induïa la diferenciació espontània de les hESC i en dificultava el manteniment. La majoria de medis que es fan servir actualment contenen proteïnes derivades o purificades a partir de fonts d'origen animal ja que això permet una millor estandardització dels ingredients i el seu cost és generalment més reduït. Més endavant es va reemplaçar el FBS per substituïts del sèrum com el *Knockout Serum Replacement* (KO-SR) (Invitrogen) (Amit et al., 2004) que presenta una composició més o menys definida i que té com a component principal l'albumina sèrica bovina. Aquest substituït del sèrum permet mantenir un cultiu estable de les hESC amb una taxa de diferenciació espontània molt baixa. En l'actualitat el KO-SR és la font de proteïna més utilitzada per el cultiu de les hESC. Recentment es va demostrar que si al medi basat en el KO-SR se li afegia una petita quantitat de FBS augmentava la taxa d'èxit del procés de derivació de les línies de hESC (Chen et al., 2009). Aquesta estratègia també l'hem fet servir al *paper 2*.

La tendència actual dels grups que treballen amb hESC és anar substituint tots els productes d'origen animal per alternatives recombinants o d'origen humà. Així els cultius lliures de xenobiòtics estan més a prop d'un possible ús en teràpia cel·lular ja que s'elimina la possibilitat de transmissió de patògens d'origen animal i s'elimina el rebuig immunitari que puguin causar les proteïnes animals amb les que han estat en contacte. Fins l'any 2006 no es va aconseguir la primera derivació de línies de hESC en condicions lliures de xenobiòtics (Ellerstrom et al., 2006). En aquest cas es va fer servir sèrum humà com a substituït del KO-SR, però de nou va aparèixer el problema d'una gran tendència a la diferenciació de les línies al fer servir derivats del sèrum poc refinats. Altres grups han desenvolupat amb èxit medis lliures de xenobiòtics que permeten derivar i/o mantenir en cultiu les hESC (Li et al., 2005) mentre que d'altres descriuen com tota una sèrie de medis sense components d'origen animal induïen una diferenciació espontània que no permet el cultiu a llarg termini de les hESC (Rajala et al., 2007). En els últims anys han aparegut nous medis i suplementos lliures de xenobiòtics específics pel cultiu de les hESC. Un exemple és el medi desenvolupat per Invitrogen, el KO-SR Xeno-Free que, suplementat amb el *Growth Factor Cocktail Xeno-Free* (Invitrogen), intenta substituir al KO-SR habitual (abordat al *paper 5*). Recentment també ha estat descrit el medi TeSR2 (Stemcells Technologies) que presenta una composició 100% lliure de proteïnes d'origen animal. Al nostre laboratori hem desenvolupat un nova font de proteïna a partir de derivats del sèrum humà capaç de substituir les fonts proteiques habituals en el cultiu de les hESC amb la col·laboració de l'Institut Grifols, S.A. (Barcelona, Spain, <http://www.grifols.com>) (abordat al *paper 5*).

Una altre tendència en el camp del cultiu de les hESC és la utilització de medis químicament definits que permeten entendre quines són les molècules i els mecanismes que mantenen els cultius en un estat de pluripotència. També permeten definir millor quins són els factors de creixement i quines són les concentracions que permeten una diferenciació dirigida cap a un tipus cel·lular definit. L'any 2005, Li et al. va desenvolupar un medi de cultiu definit a base de factors

de creixement humans recombinants com el b-FGF, *stem cell factor* (SCF), *leukemia inhibitory factor* (LIF) i *flt3 ligand* (FL) que permetien el manteniment i l'expansió de les hESC (Li et al., 2005). Poc després, el grup de Michael Snyder va desenvolupar un nou medi definit anomenat HESCO format principalment per Wnt3, FGF, insulina, transferrina, April/BAFF, colesterol i albúmina (Lu et al., 2006). Simultàniament, el grup de Sheng Ding va desenvolupar un medi definit basat en els suplementes N2 i B27 (Invitrogen) que permet mantenir en cultiu indefinit les hESC (Yao et al., 2006). Recentment, han aparegut al mercat nous medis formulats específicament per al cultiu de hESC amb composició definida. Un exemple es el medi mTeSR1 que permet cultivar les hESC sense cap tipus de cèl·lules de suport en contacte directe o a través de medi condicionat (Ludwig et al., 2006).

3.3.3.3 Mètodes d'expansió de les hESC

Hi ha diversos mètodes per al sub-cultiu de les hESC en el seu manteniment rutinari. Segons les condicions de cultiu explicades anteriorment, els mètodes més utilitzats per expandir les cèl·lules són mitjançant una estratègia mecànica o enzimàtica.

L'estratègia mecànica consisteix en fragmentar les colònies de hESC en petites peces formades per unes 20-200 cèl·lules i transferir-les a una nova placa. Aquest mètode requereix que les cèl·lules estiguin en co-cultiu amb cèl·lules de suport ja que permet la formació de colònies més denses amb un gruix superior. Es poden fer servir eines fabricades a mà a partir de pipetes *pasteur* estirades al foc o bé eines comercials com el STEMPRO® EZPassage™ d'Invitrogen o capil·lars de plàstic acoblats a una micropipeta dissenyats per la manipulació de pre-embrions humans (Stripper micropipette, Mid Atlantic i Stripper tips, de 150 µm de diàmetre). Encara que aquest mètode és lent i no permet una expansió molt ràpida de les hESC és el que sotmet a les cèl·lules a una menor pressió de selecció.

L'estratègia enzimàtica consisteix en l'expansió de les hESC mitjançant solucions enzimàtiques que disgreguen les colònies en cèl·lules individuals o en petits grups cel·lulars fins a 20 cèl·lules. Aquest mètode és més adient per a l'expansió de les hESC cultivades sobre matrius proteiques ja que les colònies tendeixen a créixer més planes i es fa difícil el seu fraccionament mecànic. El enzims que es fan servir habitualment són la tripsina, la col·lagenasa i la dispasa. La tripsina és un enzim potent que disgrega les colònies fins a cèl·lules individuals o petits grups mentre que la dispasa i la col·lagenasa tendeixen a aixecar les colònies en peces més grans essent així una estratègia menys agressiva per a la línia cel·lular. Aquesta estratègia permet una expansió ràpida i eficient de les línies i evita tota contaminació amb altres poblacions cel·lulars de suport.

3.3.4 CARACTERITZACIÓ

Les hESC són cèl·lules amb unes propietats molt característiques. Són les úniques cèl·lules que, de forma espontània, tenen la capacitat de formar tots els tipus cel·lulars de l'organisme. És

important dur a terme una caracterització acurada i exhaustiva per tal de poder definir inequívocament la població de hESC, demostrant així la seva pluripotencialitat.

Els assajos de pluripotència van encaminats en primer lloc a evidenciar la presència de proteïnes que serveixin com a marcadors per definir la població de hESC. En segon lloc s'ha de demostrar la capacitat d'aquestes cèl·lules per formar teixits procedents de les tres capes germinal primordial de l'embrió: endoderm, mesoderm i ectoderm, tant *in vitro* com *in vivo*.

3.3.4.1 Marcadors de pluripotencia

Actualment hi ha descrita una bateria de marcadors bioquímics i moleculars que defineixen específicament la població de hESC. Alguns d'aquests marcadors havien estat descrits en primer lloc en les cèl·lules del carcinoma embrionari i més endavant es va comprovar que l'expressió fisiològica d'aquestes molècules corresponia a les hESC (Andrews et al., 1996; Andrews et al., 2005b). De tota manera, l'expressió d'alguns d'aquests marcadors no és exclusiva de les hESC.

L'expressió de la fosfatasa alcalina (AP) és un dels marcadors que s'han fet servir tradicionalment. Encara que l'AP no és un enzim exclusiu de les hESC, té l'avantatge que és un marcador de fàcil i ràpida identificació. Durant els primers subcultius en les fases primerenques de la derivació de hESC, el test d'AP permet comprovar d'una forma ràpida si les cèl·lules que s'estan expandint són realment hESC i no cèl·lules procedents del trofoderm o teixits ja diferenciats a partir de les hESC.

La detecció de la telomerasa és un altre dels tests utilitzats per caracteritzar una línia de hESC. La telomerasa és una ribonucleoproteïna que té la funció principal de mantenir la llargada dels telòmers. L'escurçament dels telòmers és el motiu principal de l'envelliment cel·lular i per aquest motiu la telomerasa s'expressa en aquells tipus cel·lulars que requereixen mantenir un estatus jove indefinidament tal com les cèl·lules germinals o les hESC. Les línies de hESC mantingudes *in vitro* es consideren línies immortals i per tant es poden mantenir en cultiu de forma indefinida (Miura et al., 2004).

Actualment hi ha descrita tota una bateria de marcadors de superfície específics de pluripotencialitat, l'expressió dels quals defineix la població de les hESC. El 2005 es va desenvolupar el que es coneix amb el nom de ISCI project (*The International Stem Cell Initiative*) on s'estableixen quins han de ser els criteris per a una caracterització acurada de les línies de hESC (Andrews et al., 2005a). Les molècules a les que fa referència són marcadors més específics i delimiten d'una forma acurada la finestra de pluripotencialitat de les hESC ja que són marcadors que es deixen d'expressar ràpidament una vegada que les hESC entren en alguna via de diferenciació. Els glicolípidis de la família de els *Stage Specific Embryonic Antigen* (SSEA) són uns marcadors de superfície habituals en la caracterització de les hESC (Andrews et al., 1996; Thomson et al., 1998). En concret l'SSEA3 y l'SSEA4 són marcadors característics que defineixen l'estat de pluripotència.

Quan les hESC entren en una ruta de diferenciació es habitual que activin l'expressió de l'SSEA1 el qual es considera un marcador de diferenciació primerenca en les hESC, mentre que aquest mateix marcador defineix la població pluripotent de les mESC. Les glicoproteïnes de la família del *Tumor Related Antigen* (TRA) també són marcadors habituals que defineixen la població de hESC (Andrews et al., 1996). En concret, el TRA1-60 i el TRA1-81 són dos marcadors clàssics l'expressió dels quals es posa en evidència durant la caracterització.

Encara que no es coneixen completament els mecanismes moleculars que mantenen l'estatus de pluripotència de les hESC, en l'actualitat hi ha descrit diversos factors de transcripció i rutes metabòliques que són pròpies de la fisiologia de les hESC i que són fonamentals pel manteniment d'estat d'indiferenciació que les caracteritza. Alguns d'aquests factors de transcripció s'ha utilitzat com a marcador específic per definir la població de hESC servint així per posar en evidència una bona funcionalitat dels mecanismes que regulen la pluripotència en aquestes cèl·lules. La proteïna clàssica que defineix l'estatus de pluripotència és OCT4 que pertany a la família de factors de transcripció POU (Nichols et al., 1998; Niwa, 2001; Scholer et al., 1990). Les hESC han d'assolir uns nivells d'expressió de OCT4 dins d'uns valors molt definits per mantenir l'estat de pluripotència ja que un increment d'aquests valors indueix a la diferenciació cap a llinatges mesodèrmics o endodèrmics mentre que una reducció pot activar la diferenciació cap a trofectoderm (Niwa et al., 2000). Així i tot aquest factor de transcripció es considera un marcador específic per definir la població de hESC. Un altre factor de transcripció que juga un paper fonamental en el manteniment de l'estatus de pluripotencialitat és la proteïna de la família *homeobox* NANOG la qual s'encarrega d'activar altres gens fonamentals per al manteniment indiferenciat de les hESC. Al contrari que amb OCT4, una expressió elevada d'aquest factor no indueix cap tipus de diferenciació, mentre que si disminueixen els seus nivells d'expressió les hESC poden diferenciar-se cap a qualsevol llinatge primitiu (Hatano et al., 2005; Hyslop et al., 2005). Com que la reducció de l'expressió de NANOG comporta una forta tendència cap a la diferenciació, aquest és un bon marcador de pluripotència de les hESC i un bon indicador del seu estatut d'indiferenciació. L'expressió del factor de transcripció SOX2 regula l'expressió del factor de creixement *FGF4* i sembla que pugui tenir un paper important en el manteniment de la pluripotència de les hESC així com un paper fonamental en l'organització de la diferenciació en els primers estadis del desenvolupament embrionari (Avilion et al., 2003; Richards et al., 2004). SOX2 és també un dels marcadors moleculars que es consideren importants per definir la població de les hESC.

3.3.4.2 Capacitat de diferenciació

El següent pas de la caracterització és demostrar la capacitat de les hESC per formar teixits procedents de les tres capes germinals primordials de l'embrió (mesoderm, endoderm i ectoderm) ja que al poder entrar en cadascuna de les tres vies primitives de diferenciació queda demostrada la seva capacitat per formar qualsevol teixit de l'organisme. Hi ha dos mètodes principals per demostrar aquesta capacitat: el test de diferenciació *in vitro* i el test de diferenciació *in vivo*.

El test de diferenciació *in vitro* consisteix en cultivar les hESC en condicions que permeten la diferenciació majoritària cap als tres llinatges embrionaris per separat. L'any 2000 Itskovitz-Eldor et al. (Itskovitz-Eldor et al., 2000) va establir un mètode reproduïble per la formació de cossos embrioideus (EB) mitjançant el cultiu en suspensió de les colònies d'ESC establint així un punt de partida per molts protocols de diferenciació dirigida. A partir de la formació d'EB les hESC es poden diferenciar espontàniament o bé es cultiven en medis i substrats específics, adients per a la diferenciació cap al llinatge cel·lular que interessa. Els protocols que es fan servir són poc refinats ja que no tenen com a objectiu obtenir una població pura o altament purificada d'un tipus cel·lular concret sinó que pretenen evidenciar la presència o absència de determinats tipus cel·lulars representatius del seu llinatge embrionari.

Per la formació de teixit endodèrmic, es cultiven els EB en medis enriquits amb FBS sobre substrats simples com la gelatina. De fet, aquest protocol seria un exemple de protocol de diferenciació espontània en el qual es poden arribar a trobar petites poblacions procedents de les tres capes germinals. En el cas de l'endoderm, després de 2-3 setmanes de cultiu ja es poden apreciar estructures globulars i glandulars que es tenyeixen positivament per marcadors d'endoderm tals com ara FOXA2 o α -fetoprotein. Rarament s'arriba a identificar quina és la població concreta de diferenciació terminal en aquesta condició, però existeixen protocols concrets per a l'obtenció de derivats endodèrmics definits com illots pancreàtics productors d'insulina i glucagó (Segev et al., 2004) o cèl·lules similars a hepatòcits (Rambhatla et al., 2003).

La diferenciació cap a derivats mesodèrmics es pot potenciar afegint al medi de cultiu de molècules com l'àcid ascòrbic, el DMSO, l'azacitidina o la ciclosporina A i factors de creixement com Wnt3a, activin A, BMP-4 i BMP-2. Amb aquestes condicions de cultiu es potencia especialment la població de derivats musculars tals com els cardiomiòcits funcionals identificats per l'expressió de α -sarcomeric actinin i per GATA-4 o cèl·lules de la musculatura llisa marcades per la *smooth muscle actin*. Els primers són especialment útils durant la caracterització ja que durant el cultiu *in vitro* entren en contracció rítmica, cosa que facilita la seva identificació fins i tot sense cap tipus de tinció o quantificació molecular (Kehat et al., 2001; Xu et al., 2002). També existeixen protocols definits per a l'obtenció d'altres derivats mesodèrmics com ara progenitors hematopoètics CD45+ i CD34+ ((Chadwick et al., 2003; Kaufman et al., 2001; Vodyanik et al., 2005) i *paper 4 i 5*), cèl·lules endotelials que expressen PECAM1, vWF i *human VE-cadherin* (Levenberg et al., 2002) o poblacions de la línia condrogènica que expressen marcadors propis com SOX9, col·lagen tipus II i proteoglicans (Khillan, 2006; Sui et al., 2003).

Les condicions de cultiu per a la formació de derivats ectodèrmics (especialment neuro-ectodèrmics) són les que presenten més peculiaritats però també són les més fàcils d'obtenir ja sigui per una tendència natural de les hESC o bé perquè les condicions de cultiu que es fan servir actualment condicionen d'alguna manera la diferenciació cap a aquest llinatge embrionari. En general es fan servir medis lliures de derivats del sèrum però enriquits amb suplementes que s'han fet servir tradicionalment per al cultiu de neuroesferes com l'N-2 i el B-27. Per potenciar la diferenciació cap aquestes poblacions, els EB es poden co-cultivar sobre poblacions d'estroma cerebral com la línia cel·lular PA6 produint gran quantitat de derivats neuronals. En la bibliografia hi ha descrit diversos protocols per a l'obtenció de neurones positives per la β -tubulina (Reubinoff et al., 2001;

Zhang et al., 2001), incloses neurones dopaminèrgiques positives per *tyrosine hydroxylase* (Perrier et al., 2004; Schulz et al., 2004), i cèl·lules glials com els astròcits, positives per marcadors específics com GFAP o oligodendròcits (Nistor et al., 2005).

El test de diferenciació *in vivo* consisteix en induir la diferenciació espontània de les hESC una vegada injectades en ratolins SCID (*severe combined immuno-deficient*). Aquestes cèl·lules proliferen i es diferencien en els teixits on han estat injectades formant un teratoma que conté múltiples teixits procedents de les tres capes germinals primordials. Del llinatge mesodèrmic és habitual trobar teixit muscular llis i estriat, cartílag i ós; de l'endodèrmic es pot trobar epitelí digestiu primitiu, epitelí respiratori, estructures glomerulars renals i nombroses estructures glandulars; mentre que d'origen ectodèrmic és habitual trobar agrupacions neuronals, glia i epidermis (Przyborski, 2005).

Els punts d'injecció més habituals són el subcutani de la regió interescapular, intramuscular als gastrocnemis, intratesticular, sota la capsula renal o intrahepàtics. Segons el punt d'injecció la naturalesa del teratoma format pot ser diferent. Mentre que els teratomes induïts al subcutani solen estar formats per múltiples teixits madurs de creixement lent, els teratomes al fetge són de creixement ràpid i formats per teixits més indiferenciats (Cooke et al., 2006). Aquesta diferència està causada probablement per una producció diferenciada de factors de creixement propis de cada teixit així com també una diferència en el nivell de vascularització, d'espai pel creixement, etc.

3.4 CÈL·LULES MARE DE PLURIPOTÈNCIA INDUÏDA

En els últims tres anys hi ha hagut una revolució científica al camp de les cèl·lules mare embrionàries i de la medicina regenerativa a causa de l'aparició de les iPSC. Les iPSC provenen de cèl·lules somàtiques d'un fetus o d'un individu adult que han estat transduïdes amb determinats factors de transcripció. Aquest factors de transcripció es comencen a expressar a les cèl·lules somàtiques induint o reprimint l'expressió de gens que en un període d'entre 12 i 40 dies faràn que aquesta cèl·lula (que en el seu origen tenia un estatus diferenciat amb una funció definida) passi a mostrar un fenotip similar al de les ESC i es converteixi en una cèl·lula pluripotente. Aquest mètode, anomenat de reprogramació induïda, permet que una cèl·lula en un estadi terminal o molt avançat de diferenciació adquireixi les propietats de pluripotencialitat típiques de les ESC.

Des que es va clonar per primera vegada un animal vertebrat (Gurdon and Uehlinger, 1966) i posteriorment un mamífer fent servir el nucli d'una cèl·lula diferenciada (Wilmut et al., 2002), la possibilitat de reprogramar nuclis de cèl·lules somàtiques fins a un estadi de pluripotència funcional és una realitat. Més endavant es va veure que al fusionar dues cèl·lules de diferent naturalesa, la més gran i activa mitòticament era capaç d'imposar el seu patró d'expressió a l'altre tipus cel·lular (Harris, 1967). Amb aquests experiments es va demostrar que existeixen components moleculars al citoplasma que són capaços de migrar a un nucli exogen injectat i dirigir el seu perfil d'expressió (revisat a Gurdon and Melton, 2008). Arran d'aquests experiments, l'any 2006, Shinya Yamanaka va deduir que existien proteïnes nuclears a les ESC capaces de reprogramar una cèl·lula somàtica. Així doncs va seleccionar 24 gens candidats i els va sobre-expressar en cèl·lules somàtiques obtenint com a resultat cèl·lules reprogramades que mostraven característiques pròpies de les ESC. Dels 24 gens inicials, en va seleccionar 10 que eren imprescindibles per assolir una reprogramació cel·lular, però en experiments posteriors va demostrar que una combinació de només 4 factors (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* i *c-Myc*) era capaç de generar iPSC a partir de fibroblasts de ratolí (miPSC) (Takahashi and Yamanaka, 2006). Les línies cel·lulars que es varen aïllar a partir d'aquest experiment tenien una característiques morfològiques, d'expressió de marcadors i de capacitat de diferenciació molt similar al de les mESC. En aquell primer experiment, les miPSC obtingudes no eren capaces de contribuir a la formació d'un ratolí quimèric una vegada injectades en un blastocist, evidenciant un potencial de desenvolupament limitat.

Poc després, el mateix grup de Yamanaka (Okita et al., 2007) amb experiments confirmats independentment per altres dos laboratoris (Maherali et al., 2007; Wernig et al., 2007) va aconseguir miPSC amb un estatus de reprogramació més complet mitjançant una estratègia similar en la que es feia servir la reactivació de *Oct4* o *Nanog* com a criteri de selecció de les cèl·lules reprogramades. Les línies que es varen obtenir eren capaces de formar animals quimèrics i contribuir a la formació de cèl·lules de la línia germinal, demostrant així la seva pluripotencialitat.

Nomes un any després de la descripció de les iPSC de ratolí, el mateix grup liderat per Yamanaka va aconseguir la reprogramació de fibroblasts humans a iPSC (hiPSC) (Takahashi et al., 2007),

fent servir els mateixos 4 factors que varen fer servir per la reprogramació de cèl·lules de ratolí (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4* i *C-MYC*). Quasi simultàniament, 3 altres grups independents van aconseguir resultats similars (Lowry et al., 2008; Park et al., 2008; Yu et al., 2007). Poc després, el nostre laboratori va aconseguir la reprogramació de keratinocits humans (Aasen et al., 2008). Aquest últim estudi va demostrar que l'eficiència de reprogramació podia dependre del tipus cel·lular de partença. Així a partir de keratinòcits l'eficiència (1%) augmentava molt significativament respecte a l'obtinguda amb fibroblasts fins aleshores (0.01%). Les línies d'hiPSC generades presentaven unes característiques morfològiques quasi idèntiques a les hESC. A més, presentaven un patró d'expressió de marcadors de pluripotència i una capacitat de diferenciació *in vitro* molt similar al de les hESC.

Publicacions més recents han posat de manifest el fet que probablement no s'ha arribat a una combinació òptima quant al nombre o als tipus de factors de transcripció per a una eventual reprogramació ideal. De fet, dos grups (Nakagawa et al., 2008; Wernig et al., 2008a) han descrit, l'any 2008, que l'oncogen *C-MYC* era prescindible per a la reprogramació a hiPSC encara que l'eficiència del procés es veia molt reduïda. També és molt important tenir en compte el tipus cel·lular de partida per a la reprogramació ja que, depenent del seu estatus de cèl·lula més o menys multipotent, es pot reprogramar de manera més ràpida, eficient i amb menys factors. Així, recentment, s'ha vist com les cèl·lules mare neurals es poden reprogramar només amb la sobre-expressió d'un únic factor: *OCT4* (Kim et al., 2009b), encara que aquesta és una població cel·lular a la que es té un accés molt limitat. El nostre grup ha descrit recentment com cèl·lules mare del cordó umbilical criopreservades poden ser reprogramades a hiPSC en un termini curt de temps amb només els factors *OCT4* i *SOX2* (papers 6 i 7).

Tots els experiment que s'han utilitzat inicialment i en els nostres experiments han fet servir retrovirus o lentivirus per induir l'expressió dels gens candidats. Aquestes estratègies víriques comporten la integració dels transgens en el material genètic de la cèl·lula somàtica de forma irreversible la qual cosa pot comportar problemes i desequilibris en el funcionament fisiològic de la cèl·lula pluripotent resultant (discutit al apartat 6.3). Recentment han aparegut estratègies de reprogramació que permeten reprogramar les cèl·lules humanes sense cap tipus d'integració a la cèl·lula somàtica mitjançant vectors episomals (Yu et al., 2009) o factors de transcripció recombinants en la seva forma proteica (Kim et al., 2009a) (figura 4).

Fins ara són molts els treballs on s'evidencien que hi ha múltiples combinacions de factors i estratègies que poden servir per reprogramar cèl·lules somàtiques i quasi tots els factors habituals excepte *OCT4* poden ser substituïts per altres equivalents (revisat a Kiskinis and Eggan, ; Yamanaka, 2009).

3.4.1 SIMILITUDS I DIFERENCIES ENTRE LES ESC I LES iPSC

Globalment es pot dir que les iPSC i les ESC tenen moltes més característiques en comú que no aspectes diferencials. Aquesta afirmació es certa sempre i quan estiguem parlant de línies

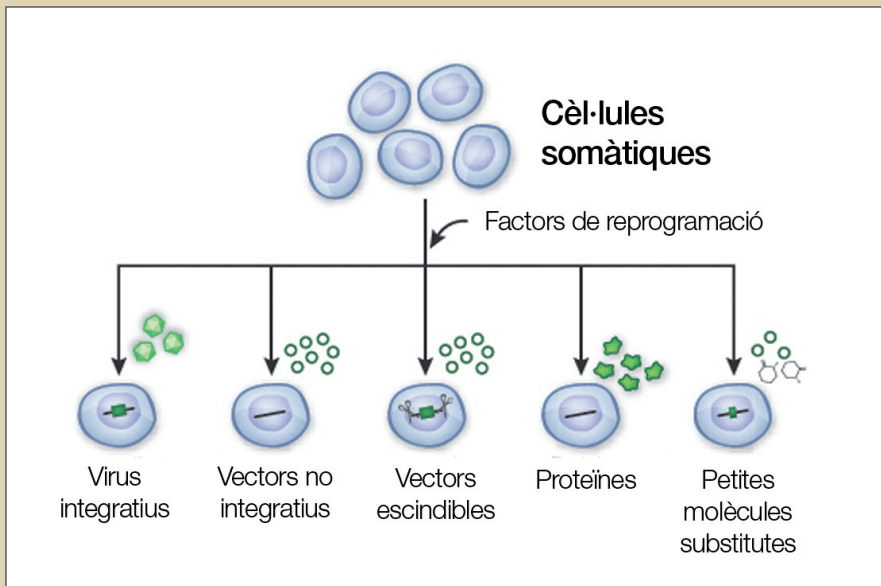


Figura 4

Mètodes de reprogramació de les cèl·lules somàtiques a cèl·lules mare de pluripotència induïda (iPSC). Els mètodes per induir la sobre-expressió dels factors de reprogramació a les cèl·lules somàtiques inclou estratègies integratives de DNA amb o sense excisió posterior del material exogen i estratègies no integratives amb DNA, proteïnes o compostos químics. (Modificat de de Souza).

reprogramades que han silenciat l'expressió del gens exògens i mantenen una regulació endògena de l'expressió dels seus factors de transcripció (Maherali et al., 2007; Okita et al., 2007; Wernig et al., 2007).

Des del punt de vista de les característiques morfològiques i les condicions de cultiu, no hi ha cap diferència entre les hESC i les cèl·lules reprogramades. Una vegada que s'estabilitza el cultiu de les línies, les colònies de hiPSC esdevenen grups compactes de cèl·lules petites amb un ràtio nucli/citoplasma elevat, molt similars morfològicament a les hESC. De la mateixa manera, les metodologies de cultiu en quant a medis i substrats són les mateixes que s'han descrit anteriorment per les hESC.

Per demostrar les propietats de pluripotència de les hiPSC s'ha de dur a terme una caracterització molt similar a la que es realitza per a les hESC. Les hiPSC també són positives a les tincions per fosfatasa alcalina i expressen el mateixos marcadors de pluripotencialitat habituals que defineixen la població de hESC: OCT4, SOX2, NANOG, SSEA3, SSEA4, TRA1-60 i TRA1-81. Les hiPSC també reprenen l'expressió de la telomerasa.

Quant a la seva capacitat de diferenciació, s'ha demostrat que les iPSC de ratolí, així com ara les mESC, tenen la capacitat de formar quimeres amb una contribució a la línia germinal (Okita et al., 2007) inclús a partir d'embrions tetraploides que només contribueixen a formar les membranes extraembrionàries, prova encara més astringent de la seva pluripotencialitat (Kang et al., 2009). Amb les iPSC d'origen humà no es pot demostrar la formació de quimeres per raons ètiques tal com succeeix amb les hESC, però s'ha vist que tenen una capacitat de diferenciació *in vitro* cap a les tres línies germinals i de formació de teratomes molt similar al de les hESC.

En les anàlisis dels nivells globals d'expressió mitjançant *microarrays* realitzats comparant la població somàtica original, les hiPSC que s'han obtingut i línies de hESC es pot comprovar com l'expressió de les hiPSC és molt semblant al de les hESC mentre que difereix molt de la població somàtica de partença (Aasen et al., 2008; Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Quant a la reprogramació epigenètica, s'ha vist que en les hiPSC els promotors dels gens de pluripotència apareixen de-metilats i que en les línies de hiPSC femella s'activa el cromosoma X que estava inactivat en la població somàtica, dos trets característics de les línies de hESC (Maherali et al., 2007). Això demostra que la reprogramació es un procés complex que modifica l'expressió global de la cèl·lula somàtica apropant-la a un perfil epigenètic i d'expressió molt proper al de les hESC.

Recentment s'ha demostrat que les línies de hiPSC que tenen els transgens de reprogramació integrats presenten un perfil d'expressió més allunyat al de les hESC que les mateixes línies de hiPSC una vegada escindit el material transgènic exogen (Soldner et al., 2009; Yu et al., 2009). Això demostra que la integració del material exogen té una repercussió important en els nivells d'expressió de gens que no són fisiològiques en les hESC segurament a causa de la influència local dels potents promotors vírics així com dels nivells anormals de producció de les proteïnes que codifiquen.

El tret diferencial principal entre les iPSC i les ESC és el seu origen. Mentre que les ESC provenen d'un estadi primerenc fisiològic de l'embrió, les iPSC provenen de cèl·lules somàtiques que ja havien conclòs un procés concret de diferenciació. De fet, part de les altres diferències que comentarem a continuació provenen de l'empremta que queda del seu origen somàtic una vegada són reprogramades.

S'ha publicat recentment que la reprogramació de les cèl·lules somàtiques pot no ser perfecte. Diversos estudis recents demostren que les hiPSC conserven una lleugera expressió pròpia de les cèl·lules somàtiques de les que provenen i que per tant difereix de l'expressió de les hESC (Chin et al., 2009). També s'ha demostrat que les hiPSC presenten un estatus de metilació significativament diferent depenent del teixit del que han estat reprogramades i en comparació amb les hESC (Doi et al., 2009).

Un altra diferència fonamental entre les hESC i les hiPSC rau en la seva diferent capacitat a l'hora de donar lloc a tumors. Els dos tipus cel·lulars tenen la capacitat de formar teratomes benignes quan són injectats en organismes immunodeprimits (Blum and Benvenisty, 2008). En el cas de les hiPSC i a causa tant de les integracions de DNA exogen al seu genoma com de l'expressió induïda dels oncogens que s'utilitzen per la reprogramació (*C-MYC*), aquestes tendeixen a formar teratocarcinomes o a malignificar una vegada diferenciades a poblacions adultes (Moriguchi et al., 2009). Un altre tret diferencial és la diferent tumorogeneicitat de les línies de iPSC de ratolí produïdes depenent de l'origen somàtic (Miura et al., 2009). Així doncs les línies de mESC i les de miPSC provinents de fibroblasts embrionaris són més similars entre elles perquè tendeixen a fer una diferenciació terminal completa quan es diferencien a una població cel·lular adulta (com per exemple en models de la malaltia de Parkinson) i no solen produir teratomes en el punt d'injecció. En canvi, les línies de miPSC procedents de fibroblasts adults o de hepatòcits difereixen més de les línies de mESC ja que tendeixen a fallar més en la seva diferenciació completa, produint una població mixta amb cèl·lules no del tot diferenciades i que per tant poden donar lloc a un teratoma amb més probabilitat.

3.4.2 LES hiPSC COM A MODEL DE MALALTIES

Les hiPSC específiques de determinats pacients malalts constitueixen valuosos models de malaltia utilitzables pel seu estudi i possible teràpia. Les hiPSC s'obtenen a partir de pacients que han de signar el corresponent consentiment informat permetent l'obtenció i la utilització de la mostra i per tant no hi ha cap tipus de debat ètic al seu voltant, a diferència del que succeeix amb els pre-embrions per l'obtenció de les hESC.

Les hiPSC permeten l'obtenció d'un model cel·lular embrionari per a l'estudi de malalties genètiques ja que amb una simple biòpsia a un pacient afecte es pot establir una línia de hiPSC específiques d'aquests pacients i mutació concreta. Aquestes línies cel·lulars poden servir per l'estudi *in vitro* dels mecanismes moleculars que intervenen en el desenvolupament de la malaltia i esbrinar així quines poden ser les millors estratègies pel desenvolupament de nous fàrmacs. En el cas de les malalties d'aparició tardana tals com l'Alzheimer o el Parkinson és difícil establir models cel·lulars *in vitro* ja que les poblacions diferenciades a partir de les hiPSC específiques del pacient poden no arribar a mostrar mai un fenotipus similar al que apareix *in vivo* a causa de les condicions ambientals tan diferents que suposa el cultiu *in vitro* incloent el temps d'aparició de la malaltia. En aquests casos caldrà establir protocols que permetin estressar les poblacions cel·lulars de tal manera que es pugui forçar l'aparició del fenotipus que ens interessa *in vitro*. Serà també més complex establir models de malalties d'etiologia no genètica o en els quals intervenen factors genètics i ambientals de diversos orígens (com per exemple l'infart de miocardi).

S'han publicat recentment diversos estudis en els que s'han fet servir hiPSC com a model de malalties genètiques. El grup de Svendsen ha demostrat que les motoneurons diferenciades a partir de hiPSC de pacients afectes d'atrofia muscular espinal presenten clars dèficits funcionals (Ebert et al., 2009). En el treball de Lee et al. s'utilitzen hiPSC específiques de pacients amb

disautonomia familiar per demostrar que les neurones del sistema autònom i sensitiu diferenciades *in vitro* presenten els mateixos nivells anòmals d'expressió gènica que les dels pacients i a més utilitzen aquestes neurones afectes per a la validació de nous fàrmacs que permetin una diferenciació i una migració correctes de les mateixes (Lee et al., 2009). Més recentment, Ye et al. ha demostrat com les línies de hiPSC reprogramades a partir de cèl·lules CD34+ purificades de sang perifèrica de pacients amb desordres mieloproliferatius mostren un fenotip normal, però quan aquestes línies de hiPSC es diferencien cap a precursors hematopoètics, aquests mostren un increment de l'eritropoesis i incrementen l'expressió de gens específics tal i com succeeix amb les cèl·lules *in vivo* dels pacients en qüestió (Ye et al., 2009).

3.5 TRANSLACIÓ CLÍNICA DE LES TERÀPIES AMB CÈL·LULES PLURIPOTENTS.

La comunitat científica internacional està fent un gran esforç en el àmbit de la recerca en cèl·lules pluripotents i la seva potencial aplicabilitat. És important plantejar-se quines són les barreres que encara existeixen i quins són els nivells de control que calen assolir en la producció i aplicació en clínica de les teràpies amb cèl·lules pluripotents. Com hem vist als apartats 3.3.1 i 3.4.2, les cèl·lules pluripotents es poden fer servir per estudiar malalties humanes per entendre la seva patogènia i buscar noves estratègies de tractament. Però la seva aplicació en teràpia cel·lular és un pas més endavant que ha d'afrontar tota una sèrie de problemes i reptes de futur. Els problemes principals que existeixen a l'actualitat per l'ús de les cèl·lules pluripotents en teràpia són: establir protocols de diferenciació controlats i eficients, resoldre el problema del rebuig immunitari resultant de la seva aplicació, eliminar el risc tumoral de la teràpia amb aquestes cèl·lules i assolir les condicions de cultiu i producció en condicions que permetin obtenir la categoria de grau clínic d'aquestes teràpies.

3.5.1 ESTABLIMENT DE PROTOCOLS DE DIFERENCIACIÓ

S'han desenvolupat diversos protocols de diferenciació que han permès avançar en la translació clínica de la recerca en hESC. Fins ara la recerca clínica en aquest àmbit s'ha dut a terme en models animals per tal de demostrar-ne la seguretat i l'eficiència. Així en ratolí s'ha demostrat que la teràpia amb cèl·lules pluripotents pot arribar a curar o pal·liar malalties de gran prevalença i repercussió. S'ha demostrat com es poden diferenciar les ESC a pàncrees endocrí que, una vegada trasplantat en ratolins diabètics presenta una funcionalitat elevada i es capaç de pal·liar els efectes de la malaltia (Kroon et al., 2008; Soria et al., 2005). També s'han fet molts estudis *in vivo* per demostrar la capacitat de les hESC per formar neurones dopaminèrgiques funcionals capaces d'integrar-se al cervell adult d'un ratolí i de pal·liar els efectes de la malaltia de Parkinson (Cho et al., 2008; Sonntag et al., 2007). Una de les patologies més estudiades en el camp de la medicina regenerativa és la lesió medul·lar traumàtica a causa de l'alta incidència i a la facilitat

per desenvolupar models animals. Molts grups han demostrat que la teràpia amb hESC diferenciades a precursors neuroectodèrmics per tractar lesions medul·lars traumàtiques resulta en una millora molt significativa de la recuperació dels animals (Cummings et al., 2005; Keirstead et al., 2005; Kumagai et al., 2009; Nakamura et al., 2005). També s'ha treballat en regeneració cardíaca en teràpia cel·lular per als infarts de miocardi. Actualment molts grups intenten entendre com el trasplantament de precursors miocàrdics, mitjançant la secreció de factors de creixement i angiogènics, poden incrementar la funcionalitat del cor després d'un accident vascular fent servir múltiples models animals tals com el ratolí, la rata, el porc o l'ovella (Kehat et al., 2004; Laflamme et al., 2007; Menard et al., 2005; van Laake et al., 2009). També s'han fet estudis en animals per demostrar la capacitat de les hESC per curar o pal·liar altres malalties tals com la disfunció de l'epiteli pigmentat de retina (Idelson et al., 2009) o la malaltia de Huntington (Aubry et al., 2008). L'aparició de la teràpia cel·lular amb hESC en l'espècie humana planteja encara dubtes a resoldre, sobretot respecte de la seguretat de les teràpies proposades. La FDA ha aprovat recentment el primer assaig clínic d'aquestes característiques. Es tracta d'un assaig proposat per la companyia Geron encaminat a demostrar la seguretat del trasplantament de precursors neuronals en pacients amb un dany agut de la medul·la espinal. El producte final consisteix en una barreja cel·lular de progenitors d'oligodendròcits i d'altres cèl·lules diferenciades en condicions GMP (*Good Manufacturing Practice*) a partir de la línia de hESC H1 la qual no va ésser produïda en aquestes condicions (Keirstead et al., 2005; Sharp and Keirstead, 2009).

Recentment han aparegut estudis que demostren la potencialitat de les iPSC per al tractament personalitzat de malalties genètiques. Per exemple, s'ha demostrat fent servir un model humanitzat de ratolí per a l'anèmia falciforme que els ratolins afectes per la malaltia poden recuperar un fenotip sa mitjançant el trasplantament de precursors hematopoètics diferenciats a partir d'iPSC obtingudes de fibroblasts del mateix ratolí prèviament corregits genèticament per a aquesta malaltia (Hanna et al., 2007). Al nostre laboratori hem empleat una estratègia similar per al tractament de l'anèmia de Fanconi (FA) partint de fibroblasts de pacients afectes per aquesta malaltia per a l'obtenció de hiPSC una vegada corregida la patologia i a continuació diferenciant a precursors hematopoètics amb fenotip sa per a un hipotètic tractament d'aquesta malaltia (*paper 3 i 4*) (figura 5). Altres grups han demostrat també que neurones dopaminèrgiques diferenciades a partir d'iPSC sanes són capaces de produir una millora fenotípica en models de rata per la malaltia de Parkinson (Wernig et al., 2008b). Fent servir el ratolí com a model de l'hemofilia A s'ha demostrat que una vegada trasplantats precursors endotelials diferenciats a partir de fibroblasts murins adults reprogramats a miPSC aquests ratolins recuperaven parcialment la capacitat de coagulació (Xu et al., 2009).

3.5.2 REBUIG IMMUNITARI

Les teràpies a partir de hESC poden induir un rebuig immunitari per part del pacient receptor ja que són de orígens genètics diferents. Així doncs s'hauria de disposar de una gran variabilitat de línies de hESC amb haplotips que cobreixin la gran majoria de la població per poder garantir un tractament que redueixi al màxim el risc de rebuig immunitari (discutit al apartat 6.1).

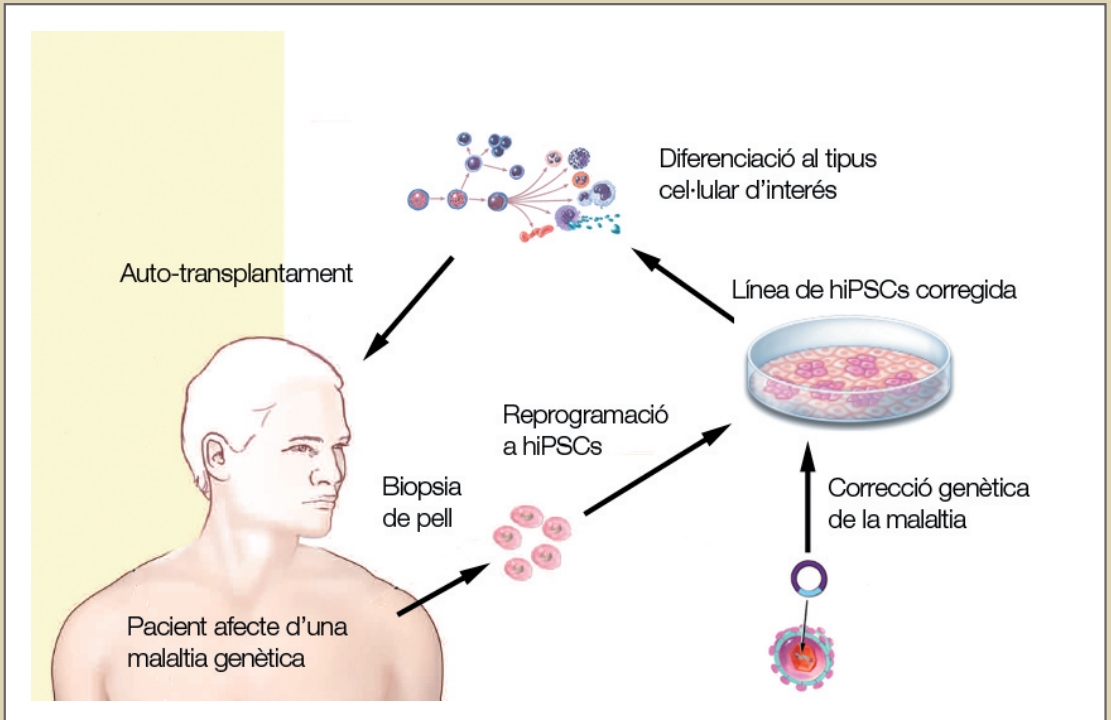


Figura 5

Esquema del tractament de malalties genètiques mitjançant la tecnologia amb iPSC. Les línies de iPSC específiques de pacients portadors de malalties genètiques obtingudes a partir de cultius primaris de pell es poden corregir in vitro amb vectors vírics per assolir un fenotipus sa. Aquestes línies de iPSC sanes es poden diferenciar a la població cel·lular que interessa i, hipotèticament fer un transplantament autòleg per tractar la malaltia del pacient. (Modificat de <http://stemcells.nih.gov/>).

En el cas de les hiPSC aquest problema quedaria resolt si es generen hiPSC per cadascun dels pacients a tractar. El seu ús es consideraria un transplantament cel·lular autòleg i per tant el risc de rebuig immunitari és molt baix i no hi hauria necessitat de tractament amb immunosupressors. Ja s'ha comentat que aquestes cèl·lules permeten aplicar una hipotètica correcció de la malaltia a nivell molecular per així poder obtenir una població progenitora del teixit diana lliure de la afecció. Una vegada trasplantats aquests precursors, el pacient podria recuperar la funcionalitat sense cap tipus de rebuig immunitari.

3.5.3 RISC TUMORAL

Abans de la utilització de les hESC o de les hiPSC en assajos clínics és molt important poder garantir la seguretat i el control del procés terapèutic. El problema fonamental en el cas de la teràpia amb cèl·lules pluripotents és establir protocols òptims que permetin el seu ús minimitzant el risc tumoral que aquestes cèl·lules comporten. Ja s'han comentat les diferències existents entre les hESC i les hiPSC quant a la seva tumorigenicitat, donant lloc les hESC i les hiPSC a teratomes benignes i les hiPSC a tumors malignes. S'ha vist augmentada la necessitat de garantir la seguretat d'aquestes teràpies ja que un estudi recent demostra que la teràpia amb cèl·lules mare neurals fetals pot donar lloc a l'aparició de tumors multifocals pocs anys després de la seva aplicació (Amariglio et al., 2009). Per orientar als investigadors sobre els passos a seguir en la translació clínica de les teràpies amb cèl·lules pluripotents la *International Society for Stem Cell Research* (ISSCR) ha definit una guia d'actuació per l'aplicació responsable de la tecnologia amb cèl·lules mare en els pacients que vulguin accedir-hi. Aquestes recomanacions estan recopilades en el document anomenat *The Guidelines for the Clinical Translation of Stem Cells* (www.isscr.org, Hyun et al., 2008). Per poder garantir la seguretat de les teràpies amb cèl·lules mare pluripotents és fonamental l'establiment de protocols reproduïbles i contrastats que permetin obtenir poblacions pures i controlades de les cèl·lules candidates per el tractament de la malaltia.

3.5.4 CONDICIONS DE PRODUCCIÓ I CULTIU DE GRAU CLÍNIC

Els nivells de control òptims per l'elaboració i l'aplicació de qualsevol tipus de teràpia de grau clínic són les que s'estableixen en les condicions GMP. Així doncs els productes produïts sota condicions GMP tenen totes les garanties de traçabilitat, salubritat i reproductibilitat dels protocols. L'aplicació d'aquestes mesures és especialment difícil quan la matèria prima és d'origen cel·lular ja que l'obtenció de mostres de pacients com a font de cèl·lules per reprogramar i els procediments dels laboratoris de fecundació *in vitro* (IVF) de on provenen els pre-embrions per la derivació de noves línies de hESC no compleixen els requeriments de les condicions GMP. Les normes de qualitat i seguretat i l'obtenció, processament i aplicació de mostres cel·lulars o teixits venen regulats per el Real Decret 1301/2006 del Ministeri De Sanitat i Consum del Govern Espanyol i el Reglament (CE) N° 1394/2007 del Parlament Europeu sobre medicaments de teràpia avançada. Aquesta legislació estableix unes condicions responsables i estrictes per a l'aplicació de les cèl·lules pluripotents en teràpies clíniques.

Per poder aplicar terapèuticament un producte cel·lular derivat de línies pluripotents és necessari que tot el procediment des de la reprogramació o derivació fins a la diferenciació terminal s'hagi dut a terme sota condicions controlades. Això implica no només uns protocols reproduïbles i una metodologia concreta de treball sinó també que tots els factors de creixement, reactius, medis de cultiu i línies cel·lulars, que es fan servir tinguin una aprovació de grau clínic o GMP. En moltes ocasions, aquests productes provenen de fonts animals tals com ara l'FBS o les MEF i si bé és cert que són productes que poden presentar una gran variabilitat entre lots, també poden obtenir una aprovació de grau clínic o GMP si el seu ús és imprescindible per dur a terme el producte

final. És especialment recomanable la substitució d'aquests productes per els seus equivalents lliures de xenobiòtics ja siguin recombinants o d'origen humà. Aquests productes permeten una major estandardització del procés, faciliten el testat de patògens, eviten la possible transmissió de patògens desconeguts d'origen animal i redueixen el risc de rebuig immunitari de les proteïnes d'origen animal una vegada trasplantades aquestes cèl·lules al pacient.

En el cas de les hESC, la població de pre-embrions humans a partir dels quals es deriven les línies de hESC provenen de donacions de pacients que han estat sotmesos a cicles de IVF en centres de reproducció assistida. L'activitat d'aquests centres també està regulada per el Real Decret 1301/2006 i per tant compleixen la categoria de material biològic de grau clínic. El procés de derivació de hESC ha implicat tradicionalment l'aplicació de la immunocirurgia per l'aïllament de la ICM i l'ús de la pronasa per eliminar la ZP la qual cosa suposa l'ús d'anticossos i proteïnes d'origen animal. És important la substitució d'aquests productes per l'aplicació clínica de les hESC. En l'actualitat existeixen protocols de derivació, cultiu i preservació de hESC que tenen la categoria de grau clínic (Crook et al., 2007) en les que s'ha fet servir productes d'origen animal que compleixen les exigències de GMP. Però aquests protocols poden ser millorats amb la utilització de material recombinant o lliures de productes de origen animal. També han estat descrits protocols de derivació de hESC i posterior diferenciació cap a poblacions cel·lulars d'interès clínic com cèl·lules mare neurals i neurones dopaminèrgiques sota condicions estrictament xeno-free i transferibles a condicions GMP (Swistowski et al., 2009).

La reprogramació de cèl·lules somàtiques a hiPSC és un procés complex i l'aprovació del seu ús en teràpies clíniques requereix de mètodes de cultiu lliures de xenobiòtics o recombinants i d'estratègies segures de reprogramació. L'elaboració de protocols lliures de productes de origen animal des de l'obtenció de la mostra fins a la reprogramació completa de les colònies és un primer pas molt important per aproximar aquestes cèl·lules a futures teràpies de medicina regenerativa (abordat al paper 5). També cal disposar d'un mètode de reprogramació segur que no suposi la integració de material genètic exogen al de la cèl·lula somàtica i que dugui a terme una reprogramació completa des del punt de vista epigenètic fins a l'estadi de cèl·lula pluripotent (abordat al paper 8). Una vegada obtingudes les línies de cèl·lules pluripotents és necessari establir protocols de cultiu, criopreservació i diferenciació que puguin complir les condicions de reproducibilitat i seguretat que exigeix la categoria de grau clínic.

04.

OBJECTIVES
OBJECTIUS

OBJECTIVES

Optimize the hESC derivation methodology and evaluate the possibility to derive hESC lines from embryos of low quality. If this proves possible, evaluate if the lines have the same pluripotency capacity than lines obtained from embryos of normal quality.

Obtain corrected hemopoietic precursors by gene therapy using iPSC derived from fibroblasts and keratinocytes from patients of Fanconi Anemia.

Evaluate if the substitution of xenobiotics with human derivatives or recombinant compounds allows for the cell reprogramming of iPSC and their indefinite culture.

Explore the possibility that HSC are a better source of cells for reprogramming to iPSC.

Evaluate the possibility to reprogram somatic cells to iPSC with non integrating plasmids.

OBJECTIUS

Optimitzar la metodologia de derivació de hESC i valorar si és possible derivar línies de hESC d'embrions considerats de baixa qualitat. Si és així, valorar si aquestes línies tenen la mateixa capacitat de pluripotència que les línies obtingudes a partir d'embrions normals.

Aconseguir precursors hematopoètics sense mitjançant teràpia gènica utilitzant iPSC generades a partir de fibroblasts i keratinocits de pacients d'anèmia de Fanconi.

Valorar si la substitució dels xenobiòtics per fonts humanes o recombinants equivalents permet la reprogramació d'iPSC i el seu cultiu indefinit.

Explorar si les HSC són una millor font cel·lular per a la reprogramació a iPSC.

Comprovar si és possible la reprogramació de cèl·lules somàtiques a iPSC fent servir plàsmids no integratius.

05.

RESULTS
RESULTATS

PAPER 1

Generation of cardiomyocytes from new human embryonic stem cell lines derived from poor-quality blastocysts

PAPER 2

Derivation of human embryonic stem cells at the Center of Regenerative Medicine in Barcelona

PAPER 3

Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells

PAPER 4

A protocol describing the genetic correction of somatic human cells and subsequent generation of iPS cells

PAPER 5

Reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions

PAPER 6

Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2

PAPER 7

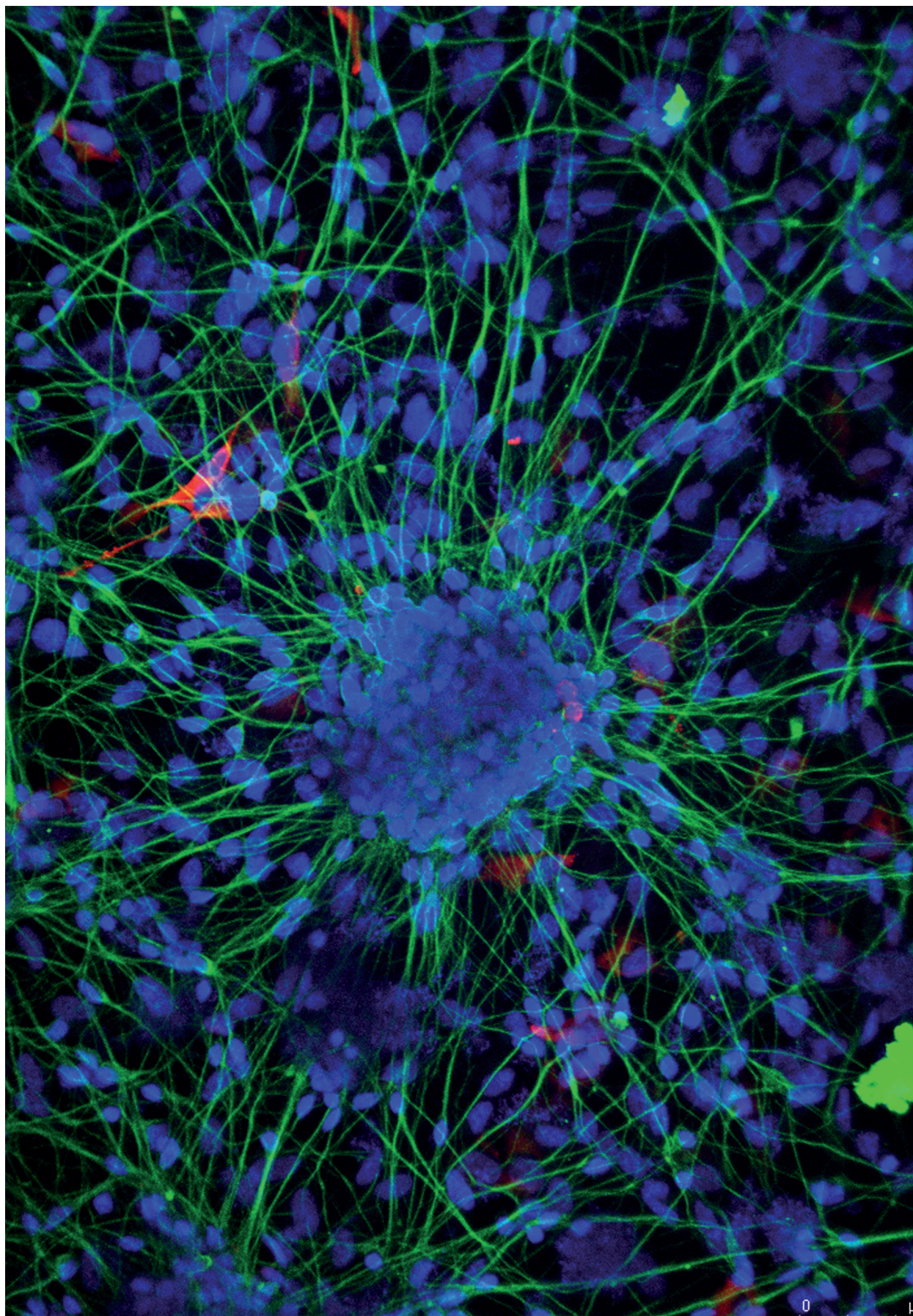
Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood cells with only two factors: Oct4 and Sox2

PAPER 8

Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector

paper 1.

Generation of cardiomyocytes from new human
embryonic stem cell lines derived from
poor-quality blastocysts



Raya A, Rodríguez-Pizà I, Arán B, Consiglio A, Barri PN, Veiga A, et al. [Generation of cardiomyocytes from new human embryonic stem cell lines derived from poor-quality blastocysts](#). Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 2008; 73: 127-35.

paper 2.

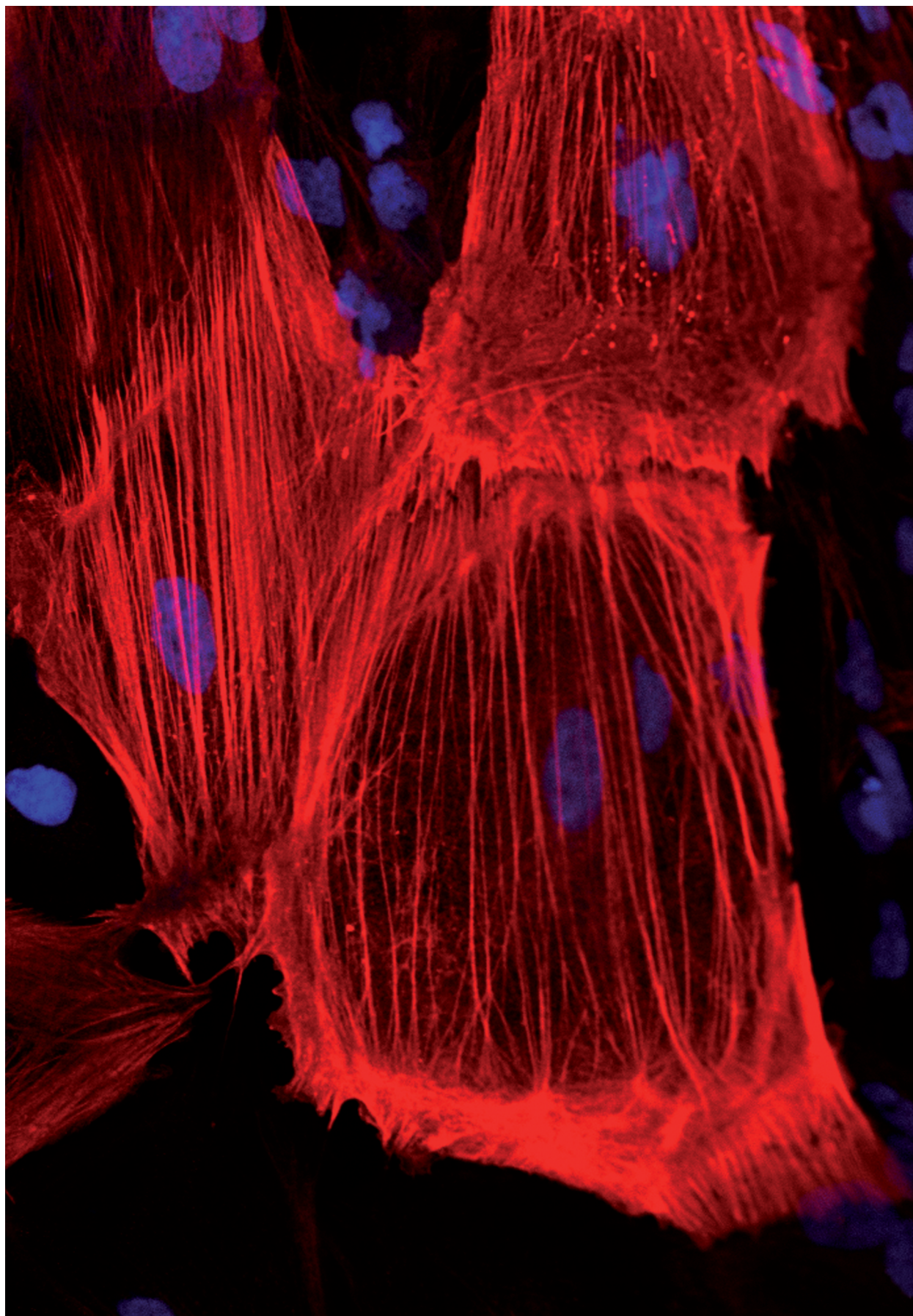
Derivation of human embryonic stem cells at the
Center of Regenerative Medicine in Barcelona



Arán B, Rodríguez-Pizà I, Raya A, Consiglio A, Muñoz Y, Barri PN, et al. [Derivation of human embryonic stem cells at the center of regenerative medicine in Barcelona.](#) In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2010; 46(3-4): 356-66.

paper 3.

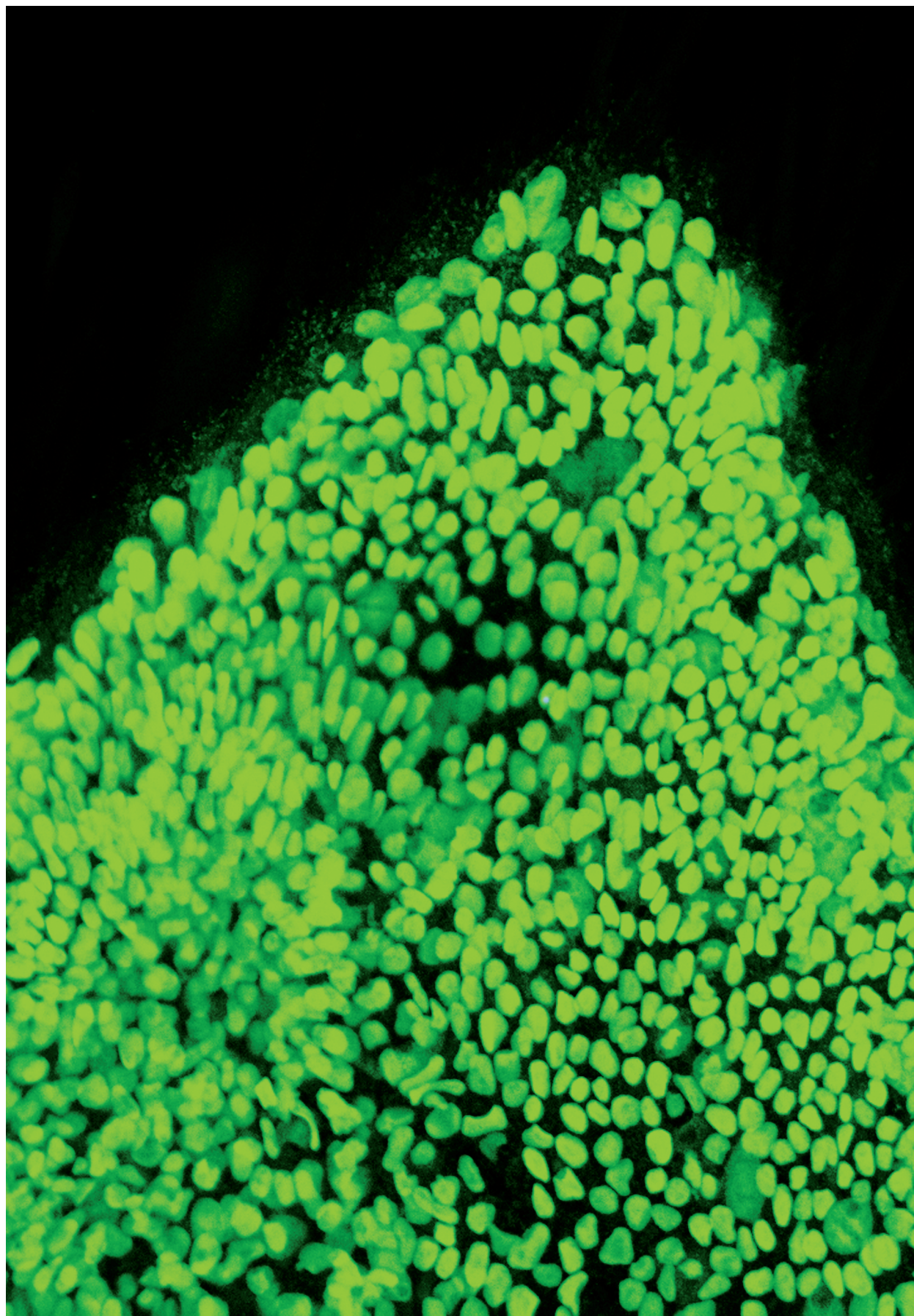
Disease-corrected haematopoietic progenitors from
Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells



Raya A, Rodríguez-Pizà I, Guenechea G, Vassena R, Navarro S, Barrero MJ, et al. [Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells.](#) Nature. 2009; 460(7251): 53-9.

paper 4.

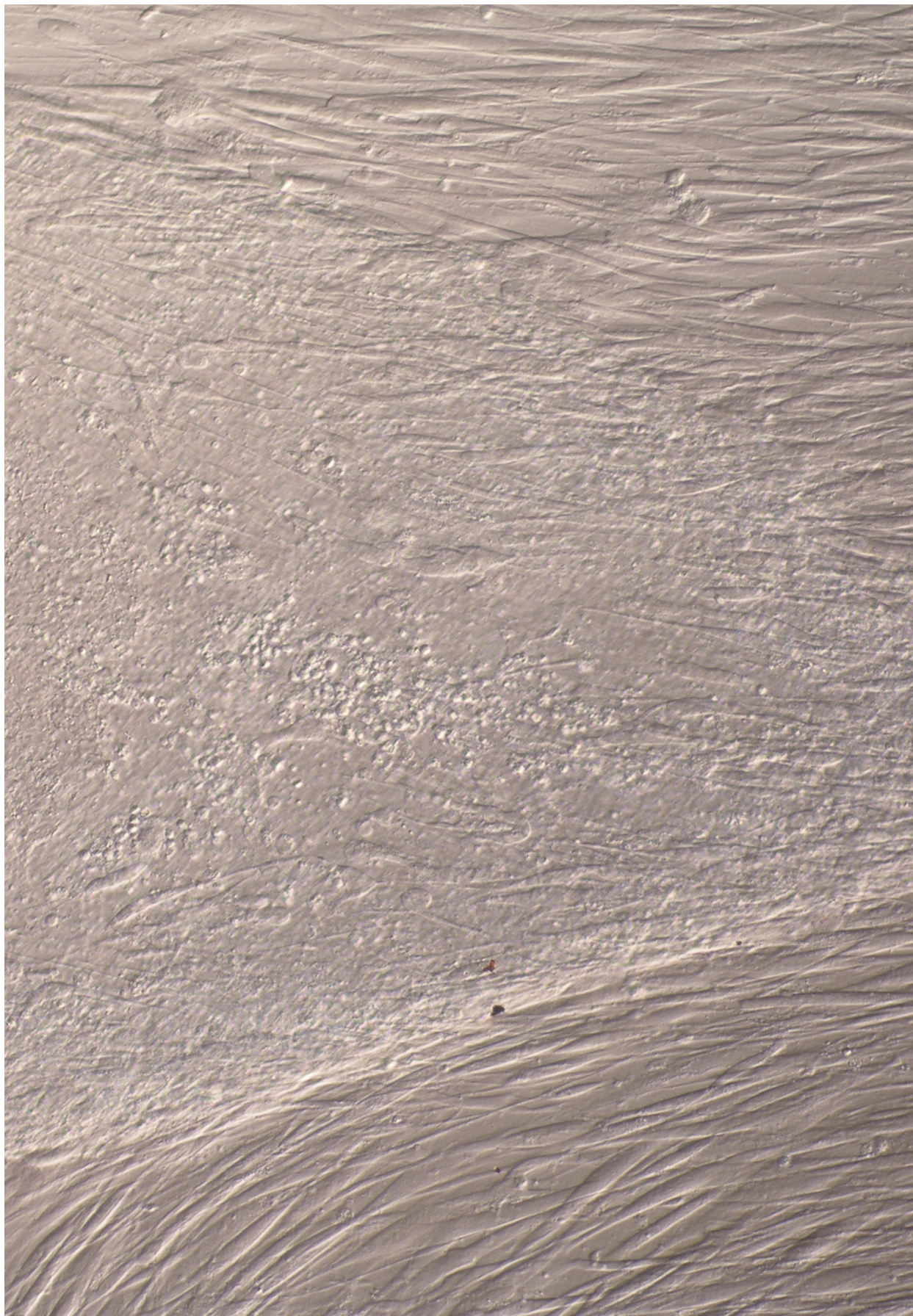
A protocol describing the genetic correction of somatic human cells and subsequent generation of iPS cells



Raya A, Rodríguez-Pizà, Navarro S, Richaud-Patin Y, Guenechea G, Sánchez-Danés A, et al. [A protocol describing the genetic correction of somatic human cells and subsequent generation of iPS cells.](#) Nat Protoc. 2010; 5(4): 647-60.

paper 5.

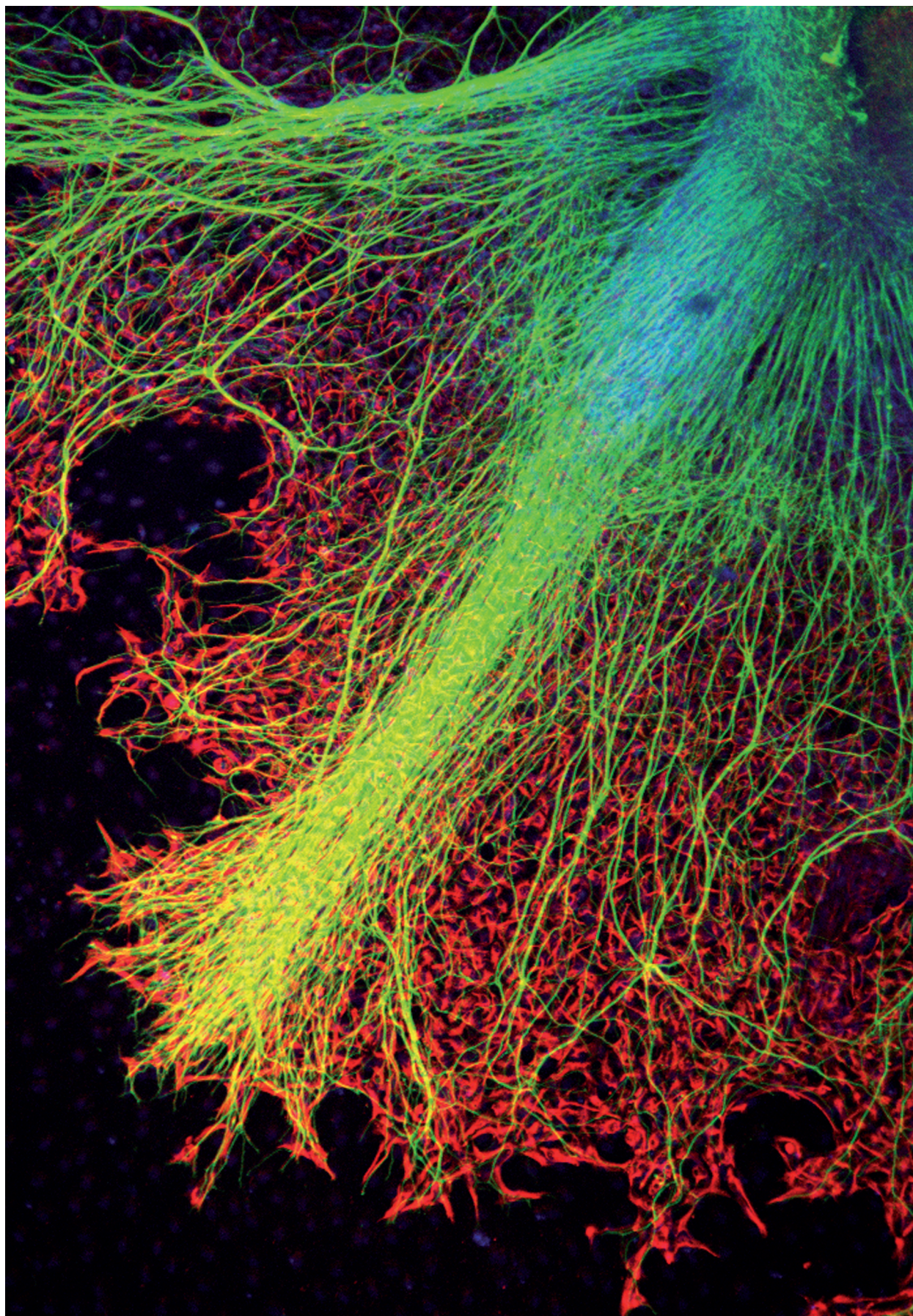
Reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions



Rodríguez-Pizà I, Richaud-Patin Y, Vassena R, González F, Barrero MJ, Veiga A, et al. [Reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells under xeno-free conditions.](#) Stem Cells. 2010; 28(1): 36-44.

paper 06.

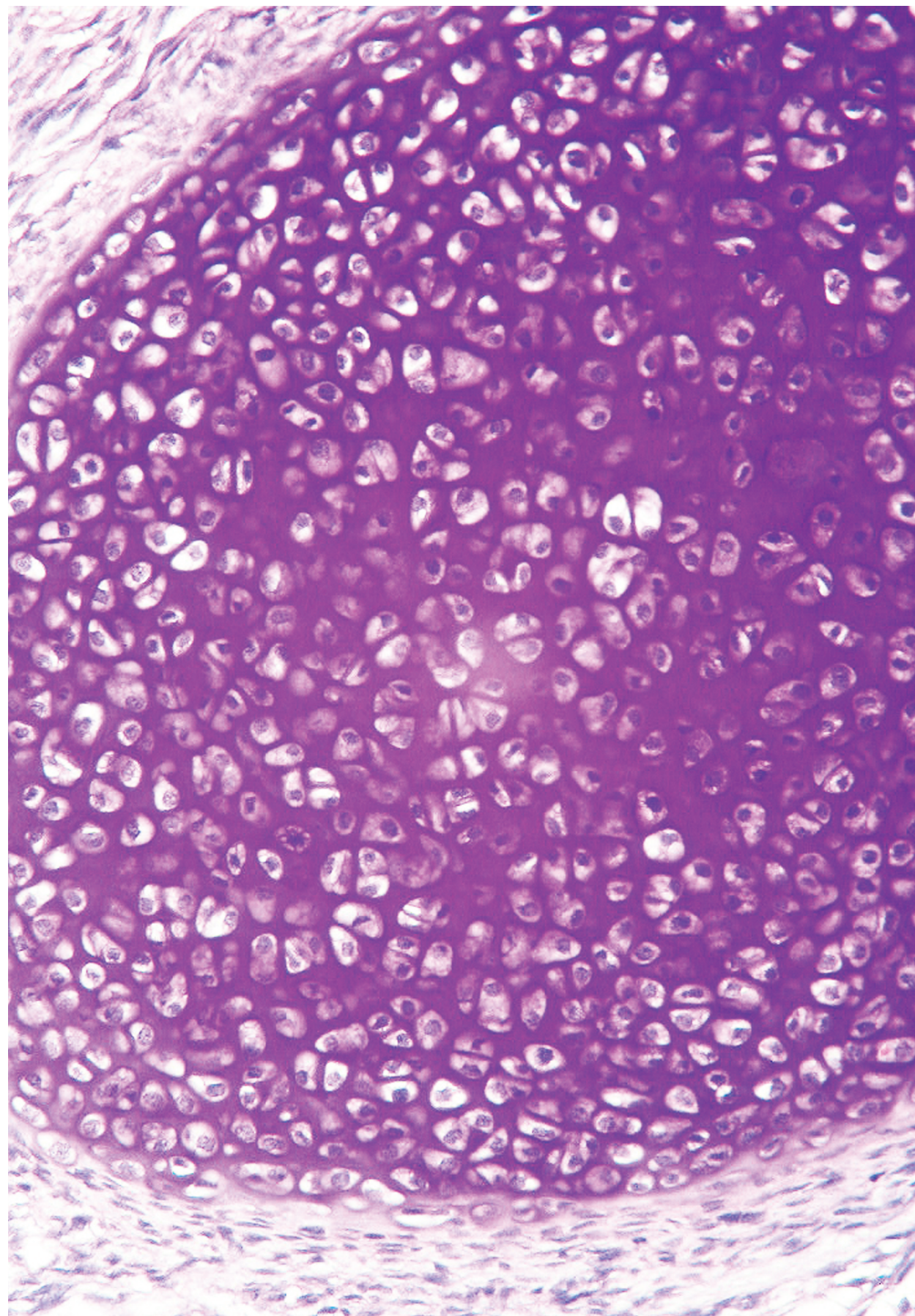
Generation of induced pluripotent stem cells from
human cord blood using *OCT4* and *SOX2*



Giorgetti A, Montserrat N, Aasen T, González F, Rodríguez-Pizà I, Vassena R, et al. [Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2](#). Cell Stem Cell. 2009; 5(4): 353-7.

paper 07.

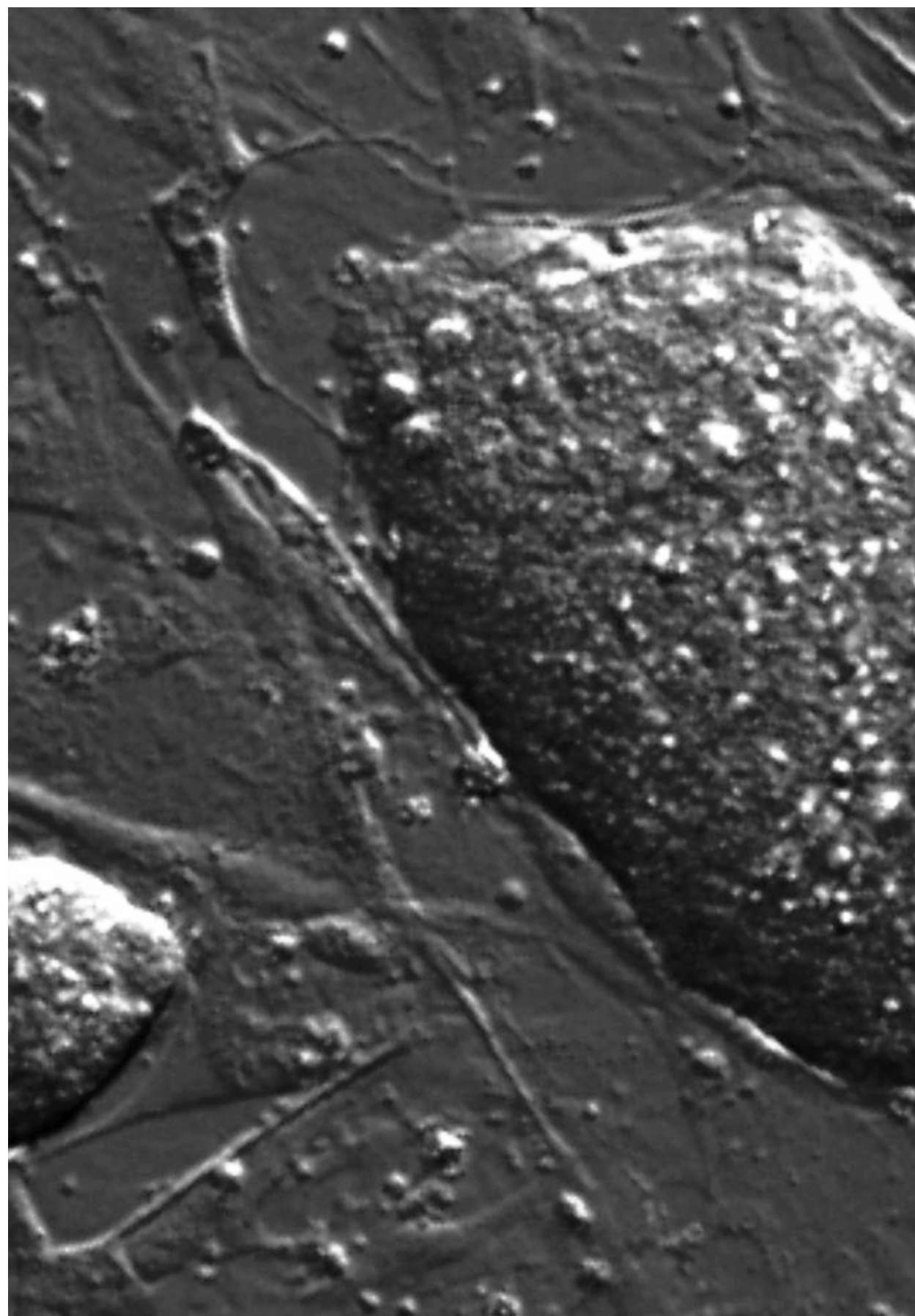
Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood cells with only two factors: *OCT4* and *SOX2*



Giorgetti A, Montserrat N, Rodríguez-Pizà I, Azqueta C, Veiga A, Izpisúa-Belmonte JC. [Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood cells with only two factors: Oct4 and Sox2.](#) Nat Protoc. 2010; 5(4): 811-20.

paper 08.

Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector



González F, Barragan Monasterio M, Tiscornia G, Montserrat Pulido N, Vassena R, Batlle Morera L, et al. [Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector](#). Proc Natl Acad Sci U S A. 2009; 106 (22): 8918-22.

06.

DISCUSSION

6 DISCUSSION

6.1 CLINICAL TRANSLATION OF hESC

The derivation of hESC lines has been an occurrence at the same time very controversial and full of hope. The new hESC cell lines are usually derived from supernumerary pre-embryos from IVF cycles, donated by the couples that have fulfilled their reproductive needs. The use of human pre-embryos for research purposes has been the cause of a worldwide ethical discussion. The most progressive legislations, such as that of Spain, allow for their use for the derivation of hESC lines.

It is important to optimize the derivation methods so that we can reduce the number of pre-embryos that are used to derive hESC lines. To this end, we have developed two different strategies. First of all we have perfected some protocols of derivation that were already available, and we have demonstrated that embryonic quality is not an absolute determinant at the time of hESC derivation, and actually even those pre-embryos which would be discarded in IVF programs can give rise to stable and normal hESC lines (paper 1). The protocols that we have used allow for an higher derivation efficiency and thus reduce considerably the number of pre-embryos needed to obtain a hESC lines (paper 2).

hESC lines represent a promise for the future in fields such as regenerative medicine, and it is important to continue to study the mechanisms that control their differentiation, and to explore their therapeutic potential. hESC have the great advantage of not having underwent any genetic manipulation in order to achieve their pluripotency, and for this reason, we can consider them a bona fide representation of the endogenous pluripotent population of the embryo.

One of the problems in the possible therapeutic use of hESC is that they have immunological characteristics specific for each line (depending on the immunological makeup of the pre-embryo used to derive them), thus rendering more difficult the immuno-compatibility with a possible patient, just as it happens, for instance, with organ or cord blood donation. The cell lines derived all over the world so far represent only partially the different haplotypes present in the human population as a whole. Once the clinical application of hESC will be a reality, it will be necessary to have an adequate range of haplotypes, which will allow for a compatible match of the HLA (human leukocyte antigen) and the lowest possible probability of transplant rejection. There are research groups that have calculated how many hESC homozygous and heterozygous are needed in order to cover a large portion of the population (Lin et al., 2009; Nakajima et al., 2007; Taylor et al., 2005) and it is calculated that the derivation and banking of 10 hESC lines homozygous for the HLA haplotypes more commonly found in the human population will cover the hypothetical necessity of about 70% of the world population. The umbilical cord blood banks represent a good model to understand the probability to have immunological compatibility within samples obtained randomly, and the potential patients that require the use of these cells.

It is important to know which hESC lines are existing and actually available, both for research than for possible future clinical applications. Our center coordinates a project funded by the European Commission for the creation of a European registry of pluripotent stem cells which collects a large portion of the information on hESC and hiPSC lines generated and/or available to the investigators worldwide (www.hescereg.eu). It is indispensable to collect exhaustive information over the lines generated in conditions that allow for their use in clinical therapy. To date, there are only 6 lines that respond to these characteristics (Crook et al., 2007).

Another aspect that makes it difficult to proceed to the clinical application of hESC is the use of xenobiotics during either their derivation or culture. In our research, we have been able to eliminate some of the most common xenocontaminants which make it difficult for hESC lines to be considered of clinical grade (papers 1 and 2). First of all, we have obtained the removal of the ZP from the pre-embryo without the use of xenobiotics, using either Tyrode's buffer or laser dissection instead of pronase. Immunosurgery is another one of those processes that use xenobiotics because the derivation protocol at this stage calls for reagents like anti-human antibodies, which are usually produced in rabbits, and serum complement proteins, coming from guinea pig. For this reason we have completely replaced immunosurgery as method to isolate the ICM with other strategies that don't imply the use of animal derived products, like whole pre-embryo seeding and the dissection and destruction of the trophectoderm.

Some of the xenobiotics more habitually used are contained in the culture medium and the substances that are routinely used for the culture of hESC, like for instance KO-SR, FBS, trypsin, collagenase, dispase and gelatin. We have described a new method of hESC culture that substitutes all these xenobiotics with their equivalent either recombinant or of human origin (paper 5). KO-SR is currently the serum substitute most commonly used for hESC culture, but it contains, as a source of protein for the culture, large amounts of albumin of bovine origin. For this reason, one of our priorities has been to identify a novel protein source derived from the fractioning of human plasma, which allows for the long-term maintenance of hESC culture. Moreover, in order to avoid the use of gelatin (of pig origin, which allows the feeder cell to adhere better to the culture dish) and of cells of mouse origin like MEF, these hESC have been cultured over a monolayer of human fibroblasts over culture dishes treated with a human recombinant matrix (CELLStart, Invitrogen). Enzymes of animal origin such as trypsin, collagenase or dispase are commonly used for the sub-culturing of hESC. In order to avoid the contact of the hESC with these enzymes of animal origin we have adopted a mechanical method of sub-culturing based on plastic pipettes and capillaries approved for clinical use.

We have therefore established the bases for a new culture method of hESC that is free of xenobiotic, a step towards reaching the clinical grade for them. Once a protocol that can reach the clinical grade level is established, the lines could be considered for a future use in clinical therapy. The derivation and culture of hESC in GMP conditions and the adherence to the guidelines of the *Agencia del Medicamento* are indispensable conditions that must be met for any clinical application.

6.2 CLINICAL TRANSLATION OF hiPSC

hiPSC have represented a significant improvement in the field of regenerative medicine because they can be a source of pluripotent cells that are patient specific. On the other hand, these cells underwent a process of cellular reprogramming, and thus of epigenetic reconfiguring. With or without genetic modifications, these cells represent a cellular state that is very close to that of hESC, but it is not clear yet whether they represent their biological equivalent.

hiPSC are as well a very important tool to establish *in vitro* models of genetic diseases because they allow to obtain pluripotent cells with the same genetic background of the patient that carries the disease we are interested in. In our studies we have seen, for instance, that somatic cells like fibroblasts of patients affected by FA are very difficult to reprogram, and therefore the integrity of the biochemical pathway of FA is fundamental to achieve cell reprogramming (paper 3).

hiPSC therefore offer another strategy to tackle problems that involve a cellular loss of function. First of all, they make it possible to have cell lines that are patient specific, and therefore are completely immunocompatible with the patient that needs the treatment. In case the target disease were of genetic origin, it would be possible to apply, either before or after the cells are reprogrammed, strategies of gene therapy to correct the genetic mutation that causes the disease. We have demonstrated the feasibility of this strategy using FA as a case study (papers 3 and 4). Besides offering a proof of principle experiment for this kind of approach, our studies have also highlighted some problems of this strategy that will have to be addressed before the clinical translation of this approach. One of the ability of hiPSC (as pluripotent stem cells) is their ability to silence the expression of viral vectors. When combining cell therapy and gene therapy, this signifies the added problem that the therapeutic transgene can be silenced in hiPSC, and that the cells derived from the hiPSC might show the diseased phenotype. In the case of FA, only the cells that did not silence the gene therapy transgene could be reprogrammed, introducing therefore an intrinsic selection for corrected cells (paper 3 and 4). Once the cell clones with the corrected transgene are established, it is possible to differentiate them into hemopoietic precursors that are disease free. When targeting another genetic disease, alternative mechanisms will need to be developed in order to select the clones that will keep expressing the corrected gene.

The possibility to reprogram different cell types while increasing the efficiency of the processes and using less factors has been demonstrated with the reprogramming of umbilical cord blood HSC to obtain hiPSC lines (paper 6 and 7). This technology allows obtaining lines iPSCs with a known HLA makeup known and compatible with a hypothetical patient from cells that are young and that are in a stage of development more primitive and thus more prone to be reprogrammed and with a smaller probability to have accumulated genetic mutations. We have also described how the HSC are the only adult stem cell population that so far can be reprogrammed with the over-expression of just the two transcription factors *OCT4* and *SOX2*, in a process of reprogramming that is shorter than for fibroblasts or keratinocytes. The large availability and genetic variability of these cells together with the easiness of their reprogramming make HSC a good cell source to produce new hiPSC lines with a specific HLA makeup which will allow for an optimal histocompatibility with a hypothetical patient receptor. Simultaneously described by Haase et al., 2009.

With the objective of bringing the research closer to applied medicine, we have obtained in our lab for the first time a system to reprogram fibroblasts to hiPSC that is completely free from xenobiotic (paper 5). First of all, we have identified a medium xeno-free that allow for the production of hiPSC in order to substitute the traditional media that employ supplements like FBS or KO-SR. Through a collaboration with Istituto Grifols S.A. we have described the use of a novel human serum derivate, intermediate step in a process to purify human albumin, to produce hiPSC. This highly standardized industrial process of purification complies with the GMP condition requirements that are specific for the pharmaceutical industry and presents the further advantage of having a low lot to lot variability due to the large amounts of starting material employed. We tested in parallel this new medium with the human serum derivate and a now xeno-free medium recently appeared in the market for the reprogramming of hiPSC. The materials and reagents that are used throughout the process are either of human origin, or are recombinant, and have been produced in GMP conditions or have a production process easily adaptable to a clinical grade production strategy. For the primary culture of fibroblasts we used medium supplemented with human serum instead of the traditional FBS supplementation, and we substituted trypsin with its recombinant and xeno-free counterpart (TrypLE select, Invitrogen). In order to obtain a higher level of

safety in the protocol, the feeder cells and the reprogrammed cells come from the same patient thus diminishing the external genetic source of material.

The ideal culture method for cells that are destined to be used in clinical therapies is one that is completely xeno-free and where all the components are completely defined. This way it is possible to increase the reproducibility and the control over the differentiation of the cells, while at the same time it is reduced to a minimum the immunological rejection risk, the risk of pathogen transmission and therefore the time that is needed to bring the protocol to the clinic. The protocols that use products of animal origin could also be approved for clinical use with time, but they require an explicit justification and specific studies that ensure their safety. With the method that we described, we have moved forward significantly its application in clinical settings, eliminating all those products that will be a barrier in the legislative process to approve these protocols.

6.3 FUTURE GOALS

Once the ideal culture conditions that facilitate the approval of the product for its intended clinical use are established, the following step is to be able to ensure the efficacy of the protocol that utilizes differentiated cell from pluripotent cell lines. This involves the establishment of standardized protocols that allow for an efficient and controlled cell differentiation towards the cell type of interest.

The safety of the process needs to be controlled at any given time, and the appearance of tumors is one of the most critical problems to tackle. All pluripotent cells are prone to produce tumors once in contact with an organism. So, in applying any therapy based on cells differentiated from pluripotent cells, there is the intrinsic risk of having leftover cells with the ability to dedifferentiate in the therapeutic cell population. If this happens, there is a high risk of teratoma formation in the injection site. Both hESC and hiPSC can produce these tumors, as explained before.

Although there are still no conclusive data, it is possible that hiPSC might have an intrinsic carcinogenic ability due to the reprogramming method used in their production. Many reprogramming strategies use retroviruses and lentiviruses for the transduction of the somatic cells with transcription factors. This brings about a series of problems related to the integration of the transgene into the host cell: a) first of all this/ese copy/es of the transgene are integrated randomly in the genome, and therefore can cause the silencing of a tumor suppressor gene; b) secondly, the promoters that allow for the transgene expression can, at the same time, activate the expression of oncogenes that are close to the integration site; c) thirdly, although the transgenes have their expression silenced in the majority of cases, it can happen that, once the hiPSC have been directed to differentiate towards a specific tissue, the transgene can reactivate with a subsequent reprogramming *in vivo* of the transplanted cells, which will probably form either a teratoma or a malignant tumor, when *C-MYC* reactivates (Okita et al., 2007). In the paper 5 we have described how it is possible to diminish the oncogenic capacity of cell lines reprogrammed in xeno-free conditions by removing *C-MYC* from the mix and using just three factors (*OCT4*, *SOX2* and *KLF4*) for fibroblasts reprogramming. On the other hand, in our laboratory we have approached this problem from another point of view by using the mouse as a model to reprogram somatic cells to miPSC without integration of the genetic material exogenous by using episomal plasmids (paper 8). More recently there have been reports of similar reprogramming strategies that allow for the reprogramming

of human somatic cells using non integrating episomal vectors (Yu et al., 2009) or using vectors that do integrate but that can be removed without trace once reprogramming is complete (Kaji et al., 2009; Soldner et al., 2009; Woltjen et al., 2009). Also, it is possible to reprogram by using the proteic recombinant form of the transcription factors, thus avoiding completely any genetic integration (Kim et al., 2009a). Recently, it has been shown that some of the transcription factors can be substituted with small molecular weight molecules like valproic acid (which is an histone deacetylase inhibitor) in substitution for *KLF4* and *C-MYC* (Huangfu et al., 2008a; Huangfu et al., 2008b) or BIX-01294 (inhibitor of histone methyltransferase) to substitute *SOX2* and *C-MYC* (Shi et al., 2008). However, so far the mechanisms that allow for the substitution of genes with small molecules remain largely unknown. This strategy should also allow for reprogramming without any sort of genetic material, but to this date it has not been possible to reprogram hiPSC completely with the exclusive use of chemical compounds.

A deeper understanding of the physiology of hiPSC will allow for gauging better their carcinogenic risk, which mechanisms are involved and therefore which strategies could be used to prevent this risk. To study and understand these cells is also an important prerequisite in order to explore their differentiation, and therefore therapeutic, potential, and to know up to which point they can be considered similar to hESC. Currently in our lab we are working to understand the tumorigenic potential of hiPSC, and to devise strategies to prevent the development of tumors once the pluripotent cell based therapy will be a reality.

There are other conceptual and experimental problems that must be approached before the clinical translation of this methodology. For instance, we do not know yet which is the most appropriate stage along the cell differentiation pathway that we need to use when transplanting hiPSC derived precursor cells in order to have the highest therapeutic capacity. Cells that are highly specialized, like cardiomyocytes or dopaminergic neurons do not have a high therapeutic potential when transplanted in their terminally differentiated state, as it looks like they do not have a high capacity to integrate into the host tissue. The transplant of precursors that are too immature, however, can cause the appearance of tumors because the presence in this population of cells still undifferentiated with teratoma forming ability. Moreover, we do not know yet the functionality of the cells that have been differentiated *in vitro*, although they resemble the *in vivo* produced population. More, it will be necessary to solve the issue of the development of a large scale production system in order to produce a number of precursor cells high enough to treat satisfactorily a human patient. Also, we will need to address the issue to identify the specific transplant location and route in order to ensure the highest precursor cell functionality.

The final goal that must be met for cell therapy to become a reality is to establish cell differentiation protocols that will allow for the transformation safely, efficiently and reproducibly a pluripotent cell population into a therapeutic cell population which, once transplanted into a patient is able to treat a specific problem of loss of cell function. The efficiency of the protocol and the control of the process is actually the most important problem of laboratories that work in developing protocols of differentiation from pluripotent cells.

This thesis contributes to the necessary acquisition of knowledge for the development of protocols for derivation and culture of hESC that bring them closer to the clinical application. Moreover, we have developed strategies based on the use of hiPSC that are safer and more efficient for the treatment of human diseases.

06.
DISCUSSION

6 DISCUSSIÓ

6.1 TRANSLACIÓ CLÍNICA DE LES hESC

La derivació de línies de hESC ha constituït un fet prometedor i polèmic al mateix temps. Les línies de hESC es deriven a partir de pre-embrions sobrants de cicles de FIV donats per les parelles després de complir les seves expectatives reproductives. La utilització de pre-embrions humans per recerca ha estat envoltada d'un gran debat ètic arreu del món. Les legislacions més progressistes com la de l'Estat Espanyol permeten el seu ús per la derivació de hESC.

Es important optimitzar les metodologies de derivació que han de permetre reduir el nombre de pre-embrions necessaris per derivar línies de hESC. Per aquest propòsit s'han dut a terme dues estratègies diferents. En primer lloc hem perfeccionat protocols de derivació ja descrits i hem demostrat que la qualitat embrionària no és determinant a l'hora d'assolir una derivació i que fins i tot amb pre-embrions que serien descartats en els programes de FIV per la transferència a les pacients és possible obtenir línies estables i normals de hESC (*paper 1*). Els protocols aplicats permeten una major eficiència de derivació i per tant redueixen el nombre de pre-embrions necessaris per obtenir una línia de hESC (*paper 2*).

Les línies de hESC constitueixen una promesa de futur en l'àmbit de la medicina regenerativa i d'aquí la importància de seguir treballant amb elles per entendre els mecanismes que controlen la seva diferenciació i explorar el seu potencial terapèutic. Les hESC tenen l'avantatge de ser cèl·lules que no han sofert cap modificació genètica i que es poden considerar com a representacions fidedignes de la pluripotència endògena de les cèl·lules primerenques de l'embrió.

Un dels problemes que es plantegen a l'hora de la possible utilització terapèutica de les hESC és el fet que aquestes cèl·lules presenten unes característiques immunològiques particulars per a cada línia dificultant així la immunocompatibilitat amb un possible receptor tal com succeeix amb la donació d'òrgans o de sang de cordó. El conjunt de línies de hESC derivades al món fins ara representen parcialment els diferents haplotips de la població humana. Una vegada que l'aplicació clínica de les hESC sigui una realitat serà necessari disposar d'un ventall ampli d'haplotips que permeti trobar el HLA (*human leukocyte antigen*) compatible de la línia cel·lular amb el del pacient i així poder evitar al màxim el rebuig immunitari. S'ha calculat quantes línies homozigòtiques o heterozigòtiques per determinats haplotips són necessàries per cobrir un percentatge elevat de la població (Lin et al., 2009; Nakajima et al., 2007; Taylor et al., 2005) i semblaria que amb la derivació i banqueig de 10 línies de hESC homozigotes per els HLA més comuns es podria cobrir la hipotètica necessitat d'aquestes cèl·lules per aproximadament el 70% de la població. Els bancs de sang de cordó umbilical són un bon model per entendre quina és la probabilitat de compatibilitat immunològica entre les mostres cel·lulars obtingudes al atzar i els potencials pacients que requereixin d'aquestes cèl·lules.

És important conèixer quines són les línies de hESC actualment existents i disponibles, tant per finalitats de recerca com per possibles finalitats clíniques futures. El nostre centre ha estat coordinador d'un projecte finançat per la Comissió Europea per la creació d'un registre europeu de cèl·lules mare pluripotents que recull una part important de la informació sobre les línies de hESC i hiPSC generades i/o disponibles pels investigadors al món (www.hescereg.eu). És imprescindible disposar d'informació exhaustiva sobre línies generades en condicions que permetin el seu ús en teràpia clínica. Actualment només existeixen 6 línies que compleixin aquestes característiques (Crook et al., 2007).

Un altre aspecte que dificulta l'aplicació clínica de les hESC és la utilització de xenobiòtics durant la seva obtenció i cultiu. En els nostres experiments hem aconseguit eliminar alguns dels xenocontaminants més habituals que dificulten la consideració de grau clínic de les noves línies de hESC obtingudes (*paper 1 i 2*). En primer lloc hem aconseguit l'aïllament de l'embrió de la ZP amb elements lliures de xenobiòtics com l'àcid Tyrode's o la dissecció làser en substitució de la pronasa. Per altre banda, la immunocirurgia és un altre dels processos que impliquen la utilització de xenobiòtics en les derivacions de hESC ja que el protocol implica reactius com ara anticossos *anti-human* habitualment de conill i proteïnes del complement del sèrum de conillet d'Índies. És per aquest motiu que hem substituït la immunocirurgia com a tècnica d'aïllament de la ICM per estratègies que no impliquen l'ús de productes d'origen animal com ara la sembra sencera del blastocist o la dissecció i destrucció del trofotoderm amb làser.

Els xenobiòtics més habituals que contenen els medis de cultiu i els reactius que es fan servir rutinàriament amb les hESC són el KO-SR, el FBS, la tripsina, la col·lagenasa, dispasa o la gelatina. Nosaltres hem descrit un nou mètode de cultiu per les hESC que substitueix tots aquests xenobiòtics per els seus equivalents recombinants o d'origen humà (*paper 5*). El KO-SR és a l'actualitat el substitut del sèrum més habitual pel cultiu de les hESC, però conté com a font de proteïna grans quantitats d'albumina d'origen boví. Per aquesta raó una de les nostres prioritats va ser descriure una nova font de proteïna procedent del fraccionament del plasma humà que permetés mantenir el cultiu de les hESC a llarg termini. A més, per evitar la utilització de gelatina (habitualment d'origen porcí i que permet una millor adhesió a la placa de les cèl·lules de suport) i de tipus cel·lulars de origen murí tals com les MEF, les línies de hESC es varen cultivar durant aquest temps sobre una monocapa de fibroblasts humans en plaques pretractades amb una matriu recombinant humana (CELLStart, Invitrogen). Els enzims d'origen animal tals com la tripsina, col·lagenasa o dispasa es fan servir habitualment per al subcultiu de línies cel·lulars tals com les hESC. Per evitar el contacte de les hESC amb aquests enzims d'origen animal varem optar per un mètode mecànic de sub-cultiu basat en pipetes amb capil·lars de plàstic aprovats per al seu ús en processos clínics.

D'aquesta manera hem establert les bases per a un nou mètode de cultiu de hESC lliure de xenobiòtics cap a l'assoliment de grau clínic de les mateixes. Una vegada s'aconsegueixi establir un protocol optimitzat i estandarditzat amb la denominació de grau clínic ja es podran considerar les línies obtingudes per al seu ús futur en teràpia clínica. La derivació i el cultiu de hESC en condicions GMP i el seguiment de la normativa marcada per l'*Agència del Medicament* són requisits indispensables per l'aplicació clínica.

6.2 TRANSLACIÓ CLÍNICA DE LES hiPSC

Les hiPSC han suposat un complement molt significatiu al camp de la medicina regenerativa ja que poden ser una font de cèl·lules pluripotents específiques de pacient. Per altre banda, aquestes són cèl·lules que han hagut de ser sotmeses a tot un procés de reprogramació cel·lular i per tant de reconfiguració epigenètica. Amb o sense modificacions genètiques aquestes cèl·lules representen un estadi molt similar al de les hESC però encara esta per definir fins a quin punt es poden considerar un equivalent biològic.

Les hiPSC són a una valuosa eina per establir models *in vitro* de malalties genètiques ja que permeten obtenir cèl·lules pluripotents de la mateixa naturalesa que les del pacient portador de la malaltia que nosaltres volem estudiar. En els nostres estudis hem vist per exemple que cèl·lules somàtiques tipus fibroblasts afectes per a la FA presenten moltes dificultat per ser reprogramades i que per tant el bon funcionament de la via de FA és fonamental per a assolir una reprogramació cel·lular (*paper* 3).

Així doncs les hiPSC ofereixen una eina particular per abordar problemes que comporten una pèrdua de funció cel·lular. En primer lloc permeten establir línies cel·lular específiques de pacient i per tant les poblacions derivades d'aquestes hiPSC presentaran una immunocompatibilitat total amb el pacient a tractar. En cas que la malaltia diana tingui un origen genètic es poden dissenyar estratègies de teràpia gènica per corregir abans o després de la reprogramació els defectes genètics que la provoquen. Nosaltres hem demostrat que aquesta estratègia és viable utilitzant com a cas d'estudi la FA (*papers* 3 i 4). A més de mostrar la prova de concepte per aquest tipus d'aproximació, els nostres estudis han posat de manifest algunes limitacions de la tècnica que hauran de tenir-se en compte abans d'intentar aplicacions clíniques. Una d'elles és la capacitat de les hiPSC (com a cèl·lules mare pluripotents) de silenciar l'expressió de transgens vírics. En el cas de combinar estratègies de teràpia gènica i cel·lular, això comporta el problema afegit que el transgen corrector pot ser silenciats en les hiPSC tornant, per tant, les cèl·lules a mostrar un fenotipus de malaltia. En el cas de la FA només aquelles cèl·lules que no silenciaven el transgen corrector eren susceptibles de ser reprogramades i per tant es va establir un mecanisme intrínsec de selecció d'aquells clons corregits (*papers* 3 i 4). Una vegada obtinguts els clons que havien estabilitzat la correcció va ser possible diferenciar a precursors hematopoètics lliures de malaltia. Quan s'intenti corregir una malaltia genètica d'un altre naturalesa s'hauran de buscar mecanismes per seleccionar els clons que mantenen l'expressió del gen que corregeix la patologia.

La possibilitat de reprogramar diferents tipus cel·lulars amb millora de l'eficiència i disminució del nombre de factors utilitzats ha estat demostrada amb la reprogramació de HSC de cordó umbilical com alternativa per obtenir línies de hiPSC (*paper* 6 i 7). Aquesta tecnologia permet obtenir línies de hiPSC amb un HLA conegut i compatible amb un pacient potencial a partir de cèl·lules joves i sanes que es troben en un estadi de desenvolupament més primitiu i per tant més susceptibles de ser reprogramades i amb una menor probabilitat d'haver-hi acumulat mutacions genètiques. A més hem descrit com les HSC són l'única població cel·lular adulta fins a la data que pot ser reprogramada amb la sobre-expressió de només els factors de transcripció *OCT4* i *SOX2*, i en un termini de temps inferior al que es requereix per fibroblasts o queratinòcits. La gran disponibilitat i variabilitat genètica d'aquesta font juntament amb la facilitat de reprogramar aquest tipus cel·lular fan de les HSC una molt bona opció a l'hora de obtenir noves línies de hiPSC amb un HLA concret que permeti una òptima histocompatibilitat amb un hipotètic pacient receptor. Simultàniament descrit per Haase et al. (Haase et al., 2009).

Amb l'objectiu d'apropar la recerca amb hiPSC al camp de la teràpia cel·lular, al nostre laboratori hem aconseguit establir per primera vegada un sistema de reprogramació de fibroblasts a hiPSC completament lliure de xenobiòtics (*paper* 5). Previament s'ha identificat un medi lliure de xenobiòtics que permet la producció de hiPSC per substituir els medis tradicionals suplementats amb FBS o KO-SR. Així, i a traves de la col·laboració amb Instituto Grifols S.A. s'ha descrit la utilització per generació de hiPSC d'un derivat del sèrum humà intermediari d'un procés de purificació de la albúmina humana. Aquest procés industrial molt estandarditzat compleix els requisits de condicions GMP propis de la indústria farmacèutica i a més presenta una variabilitat molt baixa entre lots a causa dels grans volums de

partença. Paral·lelament s'ha testat per a la reprogramació a hiPSC aquest nou medi basat en derivats del plasma humà amb un medi lliure de xenobiòtics comercial de recent aparició al mercat. Així doncs, els materials i reactius que es fan servir durant tot el procés són d'origen humà o recombinant i han estat produïts sota condicions GMP o tenen un mètode de producció fàcilment aplicable a una estratègia de grau clínic. Aquest experiment té a més a més la particularitat que s'ha dut a terme en condicions lliures de xenobiòtics des de l'obtenció mateixa de la biòpsia. Així doncs pel cultiu primari de fibroblasts es van fer servir medis suplementats amb sèrum humà en comptes dels medis tradicionals amb FBS i es va substituir la tripsina per equivalent recombinants lliures de xenobiòtics (TrypLE select, Invitrogen). Per assolir un nivell més en la seguretat del protocol, les cèl·lules que donaven suport a la reprogramació i les reprogramades provenien del mateix pacient, reduint així l'aportació cel·lular i genètica de material exogen.

El mètode de cultiu ideal de cèl·lules destinades al seu ús en teràpies clíniques és aquell completament lliure de xenobiòtics i on els seus components es troben completament definits. D'aquesta manera la reproductibilitat dels protocols i el control sobre la diferenciació és màxima al mateix temps que es redueix al mínim el risc de rebuig, el de transmissió de patògens i per tant el temps necessari per a l'aprovació d'aquests protocols en la seva aplicació clínica. Els protocols que fan servir productes d'origen animal també poden ser aprovats amb el temps però requereixen d'una justificació explícita i d'estudis específics que garanteixin la seva seguretat. Amb el mètode descrit, hem aconseguit donar un pas endavant en la translació de les teràpies amb cèl·lules pluripotents per al seu ús en teràpies clíniques eliminant tots aquells productes que suposen una barrera a l'hora de superar els tràmits per a l'aprovació d'aquests protocols.

6.3 REPTES PER AL FUTUR

Una vegada establertes quines són les condicions de cultiu ideals que faciliten l'aprovació del producte per al seu ús clínic el següent pas a seguir és poder garantir l'eficàcia de l'aplicació de cèl·lules diferenciades a partir de línies pluripotents. Això implica establir protocols estandarditzats que permetin una diferenciació eficient i controlada cap al tipus cel·lular que interessa en cada moment.

La seguretat del procés es un requisit imprescindible i l'aparició de tumors és un dels problemes més importants a resoldre. Totes les cèl·lules pluripotents són susceptibles de produir tumors una vegada són trasplantades a un organisme. Així doncs a l'aplicar teràpies cel·lulars a partir de línies pluripotents diferenciades existeix el risc que entre la població cel·lular terapèutica quedin restes de cèl·lules pluripotents o bé cèl·lules que tenen la capacitat de tornar enrere en la diferenciació. Si això succeeix hi ha un alt risc que es formi un teratoma en el lloc de la injecció. Tant les hESC com les hiPSC produeixen aquests tumors com ja ha estat descrit anteriorment.

Si bé encara no hi ha dades concloents al respecte, es possible que les hiPSC tinguin una capacitat carcinogènica intrínseca al mètode de reprogramació que s'ha fet servir. Moltes de les estratègies de reprogramació fan servir retrovirus o lentivirus per a la transducció de les cèl·lules somàtiques amb els factors de transcripció. Això comporta tot una sèrie de problemes a causa de l'integració dels transgens al genoma de la cèl·lula hoste: a) en primer lloc aquesta/es copia/es del transgen/s s'integren de forma aleatòria al genoma i poden provocar un trencament i pèrdua de funció d'algun gen supressor de

tumors; b) en segon lloc, els promotors que permetran l'expressió dels transgens poden activar al mateix temps l'expressió de oncogens endògens que es troben propers a lloc d'integració del material exogen; c) i en tercer lloc, encara que aquests transgens acaben silenciant la seva expressió en la majoria dels casos, pot succeir que una vegada que haguem dirigit la diferenciació d'aquestes hiPSC cap al teixit que ens interessa hi hagi una reactivació dels transgens amb la consegüent reprogramació *in vivo* de les cèl·lules que hem trasplantat i que acabaran formant un teratoma o un tumor maligne quan es reactiva l'oncogen *C-MYC* (Okita et al., 2007). En el *paper 5* es descriu com s'ha disminuït la capacitat oncogènica de les línies reprogramades en condicions lliures de xenobiòtics prescindint de l'oncogen *C-MYC* i fent servir només tres factors (*OCT4*, *SOX2* i *KLF4*) per a la reprogramació dels fibroblasts. Per un altre banda al nostre laboratori hem abordat aquest problema des d'un altre perspectiva fent servir el ratolí com a model animal a l'aconseguir reprogramar cèl·lules somàtiques a miPSC sense integració de material genètic exogen amb plàsmids episomals (*paper 8*). Més recentment han aparegut estratègies similars de reprogramació que permeten reprogramar les cèl·lules humanes sense que els transgens s'arribin a integrar mitjançant vectors episomals (Yu et al., 2009) o bé que es puguin treure sense deixar cap fragment una vegada que s'ha assolit la reprogramació (Kaji et al., 2009; Soldner et al., 2009; Woltjen et al., 2009). També és possible la reprogramació amb l'ús exclusiu del factors de transcripció recombinants en la seva forma proteica evitant així tota integració genètica (Kim et al., 2009a). Recentment s'ha demostrat que alguns dels factors de transcripció poden ser substituïts per molècules de baix pes molecular com ara l'àcid valproic (inhibidor de la deacetilasa d'histones) en substitució de *KLF4* i *C-MYC* (Huangfu et al., 2008a; Huangfu et al., 2008b) o el BIX-01294 (inhibidor de la metiltransferasa d'histones) en substitució de *SOX2* i *C-MYC* (Shi et al., 2008). Així i tot encara no es coneixen els mecanismes pels quals aquestes molècules faciliten la reprogramació cel·lular. Aquesta estratègia també permetria una reprogramació completament lliure de material genètic exogen però fins a la data encara no ha estat possible la reprogramació completa a hiPSC mitjançant l'ús exclusiu de compostos químics.

Un estudi profund de la fisiologia de les hiPSC ens permetria entendre millor quin és el seu risc carcinogènic, quin és el seu mecanisme de producció de tumors i per tant quines són les estratègies que ens permetrien prevenir aquest problema. Conèixer i entendre aquestes cèl·lules també es un requisit fonamental per explorar el seu potencial de diferenciació i per tant terapèutic i fins a quin punt es poden considerar cèl·lules d'una naturalesa similar a la de les hESC. Actualment al nostre laboratori estem treballant en entendre la capacitat tumoral de les hiPSC i com establir mètodes per poder controlar i prevenir l'aparició de tumors.

Hi ha altres qüestions que cal adreçar abans d'intentar utilitzar les cèl·lules pluripotents per teràpia cel·lular. No està ben determinat quin és l'estadi de diferenciació més adient per trasplantar els precursors cel·lulars obtinguts de hESC o de de hiPSC per tal que presentin la seva màxima capacitat terapèutica. Les cèl·lules altament especialitzades com els cardiomiòcits o les neurones dopaminèrgiques no sembla que presentin una gran potencialitat terapèutic si són trasplantats en el seu estat de diferenciació terminal ja que la integració congruent al teixit és poc probable. Però el trasplantament de precursors massa immadurs pot suposar l'aparició de tumors a causa de la presència de romanents de cèl·lules indiferenciades amb capacitat de formar teratomes. A més, no es coneix la funcionalitat de les cèl·lules diferenciades *in vitro* encara que són semblants a aquelles poblacions que han estat generades *in vivo*. També caldrà resoldre el problema de la producció a gran escala dels precursors d'interès de tal manera que arribem a una quantitat cel·lular mínima terapèutica que permeti tractar satisfactòriament al pacient.

Un altre problema que caldrà resoldre és el de descriure quin són els suports més adients a utilitzar i les localitzacions idònies per trasplantar les cèl·lules precursoras diferenciades de tal manera que s'assoleixi una funcionalitat suficient.

El repte final a assolir per tal que la teràpia cel·lular es converteixi en una realitat és establir protocols de diferenciació cel·lular que permetin transformar de forma segura, eficient i reproduïble una població de cèl·lules pluripotents en una població cel·lular terapèutica que, una vegada trasplantada al pacient pugui resoldre un problema de dèficit de funció cel·lular concret. L'eficiència i el control del procés és de fet el principal problema dels laboratoris que treballen en protocols de diferenciació a partir de cèl·lules pluripotents.

Aquesta tesis contribueix al progrés necessari per al desenvolupament de protocols de derivació i cultiu de hESC que les apropen a la seva utilització clínica. A més hem desenvolupat estratègies basades en hiPSC més segures i eficaces per el tractament de malalties humanes.

07.

CONCLUSIONS
CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

We have been able to optimize a protocol for the derivation of normal hESC lines, which can be applied with high efficiency to low quality embryos. The cell lines obtained with this protocol are indistinguishable, both molecularly and functionally, from those obtained using standard protocols.

We have shown a proof of principle combination of gene therapy and cell therapy, which could be used in a personalized, iPSC based, clinical protocol.

We have developed protocols completely xeno-free for the derivation and culture of iPSC reprogrammed from human fibroblasts.

We have demonstrated that *OCT4* and *SOX2* are sufficient to reprogram HSC from cord blood to hiPSC.

We have obtained the reprogramming of mouse fibroblasts to iPSC without integration of exogenous genetic material by using episomal vectors.

CONCLUSIONS

Hem aconseguir optimitzar un protocol per a la derivació de línies normals de hESC que pot ser aplicat amb èxit a embrions de molt baixa qualitat. Les línies obtingudes així són indistingibles molecular i funcionalment de línies de hESC obtingudes amb protocols estàndards.

Hem proporcionat la prova de concepte que una combinació de teràpia gènica i cel·lular podria ser utilitzada en teràpies clíniques personalitzades basades en iPSC.

Hem desenvolupat protocols completament lliures de xenobiòtics per a la generació i cultiu d'iPSC reprogramades a partir de fibroblasts.

Hem demostrat que *OCT4* i *SOX2* són suficients per reprogramar HSC procedents de cordó umbilical a hiPSC.

Hem aconseguir reprogramar fibroblasts de ratolí a iPSC lliures d'integració de material genètic exogen mitjançant la utilització de vectors episomals.

08.

REFERENCES
BIBLIOGRAFIA

Aasen, T., Raya, A., Barrero, M.J., Garreta, E., Consiglio, A., Gonzalez, F., Vassena, R., Bilic, J., Pekarik, V., Tiscornia, G., *et al.* (2008). Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nature biotechnology* 26, 1276-1284.

Abdi, R., Fiorina, P., Adra, C.N., Atkinson, M., and Sayegh, M.H. (2008). Immunomodulation by mesenchymal stem cells: a potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. *Diabetes* 57, 1759-1767.

Abdul Kadir, S.H., Ali, N.N., Mioulane, M., Brito-Martins, M., Abu-Hayyeh, S., Foldes, G., Moshkov, A.V., Williamson, C., Harding, S.E., and Gorelik, J. (2009). Embryonic stem cell-derived cardiomyocytes as a model to study fetal arrhythmia related to maternal disease. *Journal of cellular and molecular medicine*.

Amariglio, N., Hirshberg, A., Scheithauer, B.W., Cohen, Y., Loewenthal, R., Trakhtenbrot, L., Paz, N., Koren-Michowitz, M., Waldman, D., Leider-Trejo, L., *et al.* (2009). Donor-derived brain tumor following neural stem cell transplantation in an ataxia telangiectasia patient. *PLoS medicine* 6, e1000029.

Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J., and Thomson, J.A. (2000). Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental biology* 227, 271-278.

Amit, M., Shariki, C., Margulets, V., and Itskovitz-Eldor, J. (2004). Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biology of reproduction* 70, 837-845.

Andrews, P.W., Benvenisty, N., McKay, R., Pera, M.F., Rossant, J., Semb, H., and Stacey, G.N. (2005a). The International Stem Cell Initiative: toward benchmarks for human embryonic stem cell research. *Nature biotechnology* 23, 795-797.

Andrews, P.W., Casper, J., Damjanov, I., Duggan-Keen, M., Giwerzman, A., Hata, J., von Keitz, A., Looijenga, L.H., Millan, J.L., Oosterhuis, J.W., *et al.* (1996). Comparative analysis of cell surface antigens expressed by cell lines derived from human germ cell tumours. *International journal of cancer* 66, 806-816.

Andrews, P.W., Matin, M.M., Bahrami, A.R., Damjanov, I., Gokhale, P., and Draper, J.S. (2005b). Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochemical Society transactions* 33, 1526-1530.

Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K.L., and Tzukerman, M. (2001). Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 50, 1691-1697.

Aubry, L., Bugi, A., Lefort, N., Rousseau, F., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2008). Striatal progenitors derived from human ES cells mature into DARPP32 neurons in vitro and in quinolinic acid-lesioned rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 16707-16712.

Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & development* 17, 126-140.

Blum, B., and Benvenisty, N. (2008). The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Advances in cancer research* 100, 133-158.

Borstlap, J., Kurtz, A., Stacey, G., Elstner, A., Damaschun, A., Aran, B., Gerlach, J.C., Izpisua, J.C., and Veiga, A. (2008). Development of a European human embryonic stem cell registry. *Regenerative medicine* 3, 945-951.

Braam, S.R., Zeinstra, L., Litjens, S., Ward-van Oostwaard, D., van den Brink, S., van Laake, L., Lebrin, F., Kats, P., Hochstenbach, R., Passier, R., *et al.* (2008). Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via alphavbeta5 integrin. *Stem cells* (Dayton, Ohio) 26, 2257-2265.

Catalina, P., Bueno, C., Montes, R., Nieto, A., Ligerero, G., Sanchez, L., Jara, M., Rasillo, A., Orfao, A., Cigudosa, J., *et al.* (2009). Genetic stability of human embryonic stem cells: A first-step toward the development of potential hESC-based systems for modeling childhood leukemia. *Leukemia research* 33, 980-990.

Clark, A.T., and Reijo Pera, R.A. (2006). Modeling human germ cell development with embryonic stem cells. *Regenerative medicine* 1, 85-93.

Clayton, E., Doupe, D.P., Klein, A.M., Winton, D.J., Simons, B.D., and Jones, P.H. (2007). A single type of progenitor cell maintains normal epidermis. *Nature* 446, 185-189.

Conrad, S., Renninger, M., Hennenlotter, J., Wiesner, T., Just, L., Bonin, M., Aicher, W., Buhring, H.J., Mattheus, U., Mack, A., *et al.* (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult human testis. *Nature* 456, 344-349.

Cooke, M.J., Stojkovic, M., and Przyborski, S.A. (2006). Growth of teratomas derived from human pluripotent stem cells is influenced by the graft site. *Stem cells and development* 15, 254-259.

Cortes, J.L., Sanchez, L., Catalina, P., Cobo, F., Bueno, C., Martinez-Ramirez, A., Barroso, A., Cabrera, C., Ligerero, G., Montes, R., *et al.* (2008). Whole-blastocyst culture followed by laser drilling technology enhances the efficiency of inner cell mass isolation and embryonic stem cell derivation from good- and poor-quality mouse embryos: new insights for derivation of human embryonic stem cell lines. *Stem cells and development* 17, 255-267.

Crook, J.M., Peura, T.T., Kravets, L., Bosman, A.G., Buzzard, J.J., Horne, R., Hentze, H., Dunn, N.R., Zweigerdt, R., Chua, F., *et al.* (2007). The generation of six clinical-grade human embryonic stem cell lines. *Cell stem cell* 1, 490-494.

Cummings, B.J., Uchida, N., Tamaki, S.J., Salazar, D.L., Hooshmand, M., Summers, R., Gage, F.H., and Anderson, A.J. (2005). Human neural stem cells differentiate and promote locomotor recovery in spinal cord-injured mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14069-14074.

Chadwick, K., Wang, L., Li, L., Menendez, P., Murdoch, B., Rouleau, A., and Bhatia, M. (2003). Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 102, 906-915.

-
- Chavez, S.L., Meneses, J.J., Nguyen, H.N., Kim, S.K., and Pera, R.A. (2008). Characterization of six new human embryonic stem cell lines (HSF7, -8, -9, -10, -12, and -13) derived under minimal-animal component conditions. *Stem cells and development* 17, 535-546.
- Chen, A.E., Egli, D., Niakan, K., Deng, J., Akutsu, H., Yamaki, M., Cowan, C., Fitz-Gerald, C., Zhang, K., Melton, D.A., *et al.* (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.
- Chin, A.C., Fong, W.J., Goh, L.T., Philp, R., Oh, S.K., and Choo, A.B. (2007). Identification of proteins from feeder conditioned medium that support human embryonic stem cells. *Journal of biotechnology* 130, 320-328.
- Chin, M.H., Mason, M.J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., *et al.* (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell stem cell* 5, 111-123.
- Cho, M.S., Lee, Y.E., Kim, J.Y., Chung, S., Cho, Y.H., Kim, D.S., Kang, S.M., Lee, H., Kim, M.H., Kim, J.H., *et al.* (2008). Highly efficient and large-scale generation of functional dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 3392-3397.
- Choo, A., Ngo, A.S., Ding, V., Oh, S., and Kiang, L.S. (2008). Autogeneic feeders for the culture of undifferentiated human embryonic stem cells in feeder and feeder-free conditions. *Methods in cell biology* 86, 15-28.
- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Li, T., Maserati, M., Lu, S.J., Zdravkovic, T., Ilic, D., Genbacev, O., Fisher, S., *et al.* (2008). Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell stem cell* 2, 113-117.
- da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., and Nardi, N.B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science* 119, 2204-2213.
- de Souza, N. Primer: induced pluripotency. *Nature methods* 7, 20-21.
- Doi, A., Park, I.H., Wen, B., Murakami, P., Aryee, M.J., Irizarry, R., Herb, B., Ladd-Acosta, C., Rho, J., Loewer, S., *et al.* (2009). Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nature genetics* 41, 1350-1353.
- Draper, J.S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H.D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T.P., Thomson, J.A., and Andrews, P.W. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 22, 53-54.
- Dvash, T., Ben-Yosef, D., and Eiges, R. (2006). Human embryonic stem cells as a powerful tool for studying human embryogenesis. *Pediatric research* 60, 111-117.

Ebert, A.D., Yu, J., Rose, F.F., Jr., Mattis, V.B., Lorson, C.L., Thomson, J.A., and Svendsen, C.N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457, 277-280.

Eiges, R., Urbach, A., Malcov, M., Frumkin, T., Schwartz, T., Amit, A., Yaron, Y., Eden, A., Yanuka, O., Benvenisty, N., *et al.* (2007). Developmental study of fragile X syndrome using human embryonic stem cells derived from preimplantation genetically diagnosed embryos. *Cell stem cell* 1, 568-577.

Ellerstrom, C., Strehl, R., Moya, K., Andersson, K., Bergh, C., Lundin, K., Hyllner, J., and Semb, H. (2006). Derivation of a xeno-free human embryonic stem cell line. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24, 2170-2176.

Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.

Fuchs, E., and Horsley, V. (2008). More than one way to skin. *Genes & development* 22, 976-985.

Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science (New York, NY)* 287, 1433-1438.

Gluckman, E., Broxmeyer, H.A., Auerbach, A.D., Friedman, H.S., Douglas, G.W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., *et al.* (1989). Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *The New England journal of medicine* 321, 1174-1178.

Gurdon, J.B., and Melton, D.A. (2008). Nuclear reprogramming in cells. *Science (New York, NY)* 322, 1811-1815.

Gurdon, J.B., and Uehlinger, V. (1966). "Fertile" intestine nuclei. *Nature* 210, 1240-1241.

Haase, A., Olmer, R., Schwanke, K., Wunderlich, S., Merkert, S., Hess, C., Zweigerdt, R., Gruh, I., Meyer, J., Wagner, S., *et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood. *Cell stem cell* 5, 434-441.

Hanna, J., Wernig, M., Markoulaki, S., Sun, C.W., Meissner, A., Cassady, J.P., Beard, C., Brambrink, T., Wu, L.C., Townes, T.M., *et al.* (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science (New York, NY)* 318, 1920-1923.

Harris, H. (1967). The reactivation of the red cell nucleus. *Journal of cell science* 2, 23-32.

Hatano, S.Y., Tada, M., Kimura, H., Yamaguchi, S., Kono, T., Nakano, T., Suemori, H., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2005). Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity. *Mechanisms of development* 122, 67-79.

Hovatta, O., Mikkola, M., Gertow, K., Stromberg, A.M., Inzunza, J., Hreinsson, J., Rozell, B., Blennow, E., Andang, M., and Ahrlund-Richter, L. (2003). A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Human reproduction (Oxford, England)* 18, 1404-1409.

Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A.E., and Melton, D.A. (2008a). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nature biotechnology* 26, 795-797.

Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., and Melton, D.A. (2008b). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature biotechnology* 26, 1269-1275.

Hyslop, L., Stojkovic, M., Armstrong, L., Walter, T., Stojkovic, P., Przyborski, S., Herbert, M., Murdoch, A., Strachan, T., and Lako, M. (2005). Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 23, 1035-1043.

Hyun, I., Lindvall, O., Ahrlund-Richter, L., Cattaneo, E., Cavazzana-Calvo, M., Cossu, G., De Luca, M., Fox, I.J., Gerstle, C., Goldstein, R.A., *et al.* (2008). New ISSCR guidelines underscore major principles for responsible translational stem cell research. *Cell stem cell* 3, 607-609.

Idelson, M., Alper, R., Obolensky, A., Ben-Shushan, E., Hemo, I., Yachimovich-Cohen, N., Khaner, H., Smith, Y., Wisner, O., Gropp, M., *et al.* (2009). Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional retinal pigment epithelium cells. *Cell stem cell* 5, 396-408.

Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H., and Benvenisty, N. (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 6, 88-95.

Jessberger, S., Toni, N., Clemenson, G.D., Jr., Ray, J., and Gage, F.H. (2008). Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain. *Nature neuroscience* 11, 888-893.

Ji, L., Liu, Y.X., Yang, C., Yue, W., Shi, S.S., Bai, C.X., Xi, J.F., Nan, X., and Pei, X.T. (2009). Self-renewal and pluripotency is maintained in human embryonic stem cells by co-culture with human fetal liver stromal cells expressing hypoxia inducible factor 1alpha. *Journal of cellular physiology* 221, 54-66.

Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458, 771-775.

Kang, L., Wang, J., Zhang, Y., Kou, Z., and Gao, S. (2009). iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell stem cell* 5, 135-138.

Kaufman, D.S., Hanson, E.T., Lewis, R.L., Auerbach, R., and Thomson, J.A. (2001). Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 10716-10721.

Kehat, I., Kenyagin-Karsenti, D., Snir, M., Segev, H., Amit, M., Gepstein, A., Livne, E., Binah, O., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L. (2001). Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *The Journal of clinical investigation* 108, 407-414.

Kehat, I., Khimovich, L., Caspi, O., Gepstein, A., Shofti, R., Arbel, G., Huber, I., Satin, J., Itskovitz-Eldor, J., and Gepstein, L. (2004). Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 22, 1282-1289.

Keirstead, H.S., Nistor, G., Bernal, G., Totoiu, M., Cloutier, F., Sharp, K., and Steward, O. (2005). Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 25, 4694-4705.

Khillan, J.S. (2006). Generation of chondrocytes from embryonic stem cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ 330, 161-170.

Kim, D., Kim, C.H., Moon, J.I., Chung, Y.G., Chang, M.Y., Han, B.S., Ko, S., Yang, E., Cha, K.Y., Lanza, R., *et al.* (2009a). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell* 4, 472-476.

Kim, J.B., Greber, B., Arauzo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., and Scholer, H.R. (2009b). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461, 649-643.

Kiskinis, E., and Eggan, K. Progress toward the clinical application of patient-specific pluripotent stem cells. *The Journal of clinical investigation* 120, 51-59.

Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S.J., and Lanza, R. (2006). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444, 481-485.

Klimanskaya, I., Chung, Y., Meisner, L., Johnson, J., West, M.D., and Lanza, R. (2005). Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet* 365, 1636-1641.

Ko, J.Y., Lee, H.S., Park, C.H., Koh, H.C., Lee, Y.S., and Lee, S.H. (2009). Conditions for tumor-free and dopamine neuron-enriched grafts after transplanting human ES cell-derived neural precursor cells. *Mol Ther* 17, 1761-1770.

Kroon, E., Martinson, L.A., Kadoya, K., Bang, A.G., Kelly, O.G., Eliazar, S., Young, H., Richardson, M., Smart, N.G., Cunningham, J., *et al.* (2008). Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nature biotechnology* 26, 443-452.

Krtolica, A., Ilic, D., Genbacev, O., and Miller, R.K. (2009). Human embryonic stem cells as a model for embryotoxicity screening. *Regenerative medicine* 4, 449-459.

Kumagai, G., Okada, Y., Yamane, J., Nagoshi, N., Kitamura, K., Mukaino, M., Tsuji, O., Fujiyoshi, K., Katoh, H., Okada, S., *et al.* (2009). Roles of ES cell-derived gliogenic neural stem/progenitor cells in functional recovery after spinal cord injury. *PloS one* 4, e7706.

Lafflamme, M.A., Chen, K.Y., Naumova, A.V., Muskheli, V., Fugate, J.A., Dupras, S.K., Reinecke, H., Xu, C., Hassanipour, M., Police, S., *et al.* (2007). Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature biotechnology* 25, 1015-1024.

Ledran, M.H., Krassowska, A., Armstrong, L., Dimmick, I., Renstrom, J., Lang, R., Yung, S., Santibanez-Coref, M., Dzierzak, E., Stojkovic, M., *et al.* (2008). Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell stem cell* 3, 85-98.

Lee, G., Papapetrou, E.P., Kim, H., Chambers, S.M., Tomishima, M.J., Fasano, C.A., Ganat, Y.M., Menon, J., Shimizu, F., Viale, A., *et al.* (2009). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461, 402-406.

Lee, J.B., Lee, J.E., Park, J.H., Kim, S.J., Kim, M.K., Roh, S.I., and Yoon, H.S. (2005). Establishment and maintenance of human embryonic stem cell lines on human feeder cells derived from uterine endometrium under serum-free condition. *Biology of reproduction* 72, 42-49.

Levenberg, S., Golub, J.S., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., and Langer, R. (2002). Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 4391-4396.

Li, Y., Powell, S., Brunette, E., Lebkowski, J., and Mandalam, R. (2005). Expansion of human embryonic stem cells in defined serum-free medium devoid of animal-derived products. *Biotechnology and bioengineering* 91, 688-698.

Liew, C.G., Shah, N.N., Briston, S.J., Shepherd, R.M., Khoo, C.P., Dunne, M.J., Moore, H.D., Cosgrove, K.E., and Andrews, P.W. (2008). PAX4 enhances beta-cell differentiation of human embryonic stem cells. *PLoS one* 3, e1783.

Lin, G., Xie, Y., Ouyang, Q., Qian, X., Xie, P., Zhou, X., Xiong, B., Tan, Y., Li, W., Deng, L., *et al.* (2009). HLA-matching potential of an established human embryonic stem cell bank in China. *Cell stem cell* 5, 461-465.

Lowry, W.E., Richter, L., Yachechko, R., Pyle, A.D., Tchieu, J., Sridharan, R., Clark, A.T., and Plath, K. (2008). Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2883-2888.

Lu, J., Hou, R., Booth, C.J., Yang, S.H., and Snyder, M. (2006). Defined culture conditions of human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 5688-5693.

Ludwig, T.E., Levenstein, M.E., Jones, J.M., Berggren, W.T., Mitchen, E.R., Frane, J.L., Crandall, L.J., Daigh, C.A., Conard, K.R., Piekarczyk, M.S., *et al.* (2006). Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nature biotechnology* 24, 185-187.

Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., *et al.* (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell stem cell* 1, 55-70.

Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 7634-7638.

Mateizel, I., De Temmerman, N., Ullmann, U., Cauffman, G., Sermon, K., Van de Velde, H., De Rycke, M., Degreef, E., Devroey, P., Liebaers, I., *et al.* (2006). Derivation of human embryonic stem cell lines from embryos obtained after IVF and after PGD for monogenic disorders. *Human reproduction (Oxford, England)* 21, 503-511.

Meirelles Lda, S., and Nardi, N.B. (2009). Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Front Biosci* 14, 4281-4298.

Menard, C., Hagege, A.A., Agbulut, O., Barro, M., Morichetti, M.C., Brasselet, C., Bel, A., Messas, E., Bissery, A., Bruneval, P., *et al.* (2005). Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet* 366, 1005-1012.

Meyer, J.S., Shearer, R.L., Capowski, E.E., Wright, L.S., Wallace, K.A., McMillan, E.L., Zhang, S.C., and Gamm, D.M. (2009). Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 16698-16703.

Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M., *et al.* (2009). Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nature biotechnology* 27, 743-745.

Miura, T., Mattson, M.P., and Rao, M.S. (2004). Cellular lifespan and senescence signaling in embryonic stem cells. *Aging cell* 3, 333-343.

Moore, N.W., Adams, C.E., and Rowson, L.E. (1968). Developmental potential of single blastomeres of the rabbit egg. *Journal of reproduction and fertility* 17, 527-531.

Moriguchi, H., Chung, R.T., and Sato, C. (2009). Tumorigenicity of human induced pluripotent stem cells depends on the balance of gene expression between p21 and p53. *Hepatology*. 2010 Jan; 51(1):297-305.

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., and Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology* 26, 101-106.

Nakajima, F., Tokunaga, K., and Nakatsuji, N. (2007). Human leukocyte antigen matching estimations in a hypothetical bank of human embryonic stem cell lines in the Japanese population for use in cell transplantation therapy. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25, 983-985.

Nakamura, M., Okano, H., Toyama, Y., Dai, H.N., Finn, T.P., and Bregman, B.S. (2005). Transplantation of embryonic spinal cord-derived neurospheres support growth of supraspinal projections and functional recovery after spinal cord injury in the neonatal rat. *Journal of neuroscience research* 81, 457-468.

Nauta, A.J., and Fibbe, W.E. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110, 3499-3506.

Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95, 379-391.

Nistor, G.I., Totoiu, M.O., Haque, N., Carpenter, M.K., and Keirstead, H.S. (2005). Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia* 49, 385-396.

Niwa, H. (2001). Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell structure and function* 26, 137-148.

Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A.G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature genetics* 24, 372-376.

Okita, K., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448, 313-317.

Park, I.H., Zhao, R., West, J.A., Yabuuchi, A., Huo, H., Ince, T.A., Lerou, P.H., Lensch, M.W., and Daley, G.Q. (2008). Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451, 141-146.

Perrier, A.L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M.E., Bruses, J., Topf, N., Harrison, N.L., and Studer, L. (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12543-12548.

Phillips, B.W., Hentze, H., Rust, W.L., Chen, Q.P., Chipperfield, H., Tan, E.K., Abraham, S., Sadasivam, A., Soong, P.L., Wang, S.T., *et al.* (2007). Directed differentiation of human embryonic stem cells into the pancreatic endocrine lineage. *Stem cells and development* 16, 561-578.

Pickering, S.J., Minger, S.L., Patel, M., Taylor, H., Black, C., Burns, C.J., Ekonomou, A., and Braude, P.R. (2005). Generation of a human embryonic stem cell line encoding the cystic fibrosis mutation deltaF508, using preimplantation genetic diagnosis. *Reproductive biomedicine online* 10, 390-397.

Przyborski, S.A. (2005). Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immunodeficient mice. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 23, 1242-1250.

Rajala, K., Hakala, H., Panula, S., Aivio, S., Pihlajamaki, H., Suuronen, R., Hovatta, O., and Skottman, H. (2007). Testing of nine different xeno-free culture media for human embryonic stem cell cultures. *Human reproduction (Oxford, England)* 22, 1231-1238.

Rambhatla, L., Chiu, C.P., Kundu, P., Peng, Y., and Carpenter, M.K. (2003). Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell transplantation* 12, 1-11.

Reubinoff, B.E., Itsykson, P., Turetsky, T., Pera, M.F., Reinhartz, E., Itzik, A., and Ben-Hur, T. (2001). Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 19, 1134-1140.

Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature biotechnology* 18, 399-404.

Richards, M., Tan, S.P., Tan, J.H., Chan, W.K., and Bongso, A. (2004). The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22, 51-64.

Rossant, J. (1976). Postimplantation development of blastomeres isolated from 4- and 8-cell mouse eggs. *Journal of embryology and experimental morphology* 36, 283-290.

Saha, K., and Jaenisch, R. (2009). Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell stem cell* 5, 584-595.

Satin, J., Kehat, I., Caspi, O., Huber, I., Arbel, G., Itzhaki, I., Magyar, J., Schroder, E.A., Perlman, I., and Gepstein, L. (2004). Mechanism of spontaneous excitability in human embryonic stem cell derived cardiomyocytes. *The Journal of physiology* 559, 479-496.

Scholer, H.R., Ruppert, S., Suzuki, N., Chowdhury, K., and Gruss, P. (1990). New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344, 435-439.

Schulz, T.C., Noggle, S.A., Palmarini, G.M., Weiler, D.A., Lyons, I.G., Pensa, K.A., Meedeniya, A.C., Davidson, B.P., Lambert, N.A., and Condie, B.G. (2004). Differentiation of human embryonic stem cells to dopaminergic neurons in serum-free suspension culture. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22, 1218-1238.

Segev, H., Fishman, B., Ziskind, A., Shulman, M., and Itskovitz-Eldor, J. (2004). Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22, 265-274.

Shamblott, M.J., Axelman, J., Littlefield, J.W., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., Cui, Y., Cheng, L., and Gearhart, J.D. (2001). Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 113-118.

Shamblott, M.J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E.M., Littlefield, J.W., Donovan, P.J., Blumenthal, P.D., Huggins, G.R., and Gearhart, J.D. (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13726-13731.

Sharp, J., and Keirstead, H.S. (2009). Stem cell-based cell replacement strategies for the central nervous system. *Neuroscience letters* 456, 107-111.

Shi, Y., Do, J.T., Desponts, C., Hahm, H.S., Scholer, H.R., and Ding, S. (2008). A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* 2, 525-528.

Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G.W., Cook, E.G., Hargus, G., Blak, A., Cooper, O., Mitalipova, M., et al. (2009). Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136, 964-977.

Solter, D., and Knowles, B.B. (1975). Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72, 5099-5102.

Sonntag, K.C., Pruszak, J., Yoshizaki, T., van Arensbergen, J., Sanchez-Pernaute, R., and Isacson, O. (2007). Enhanced yield of neuroepithelial precursors and midbrain-like dopaminergic neurons from human embryonic stem cells using the bone morphogenetic protein antagonist noggin. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25, 411-418.

Soria, B., Roche, E., Reig, J.A., and Martin, F. (2005). Generation of insulin-producing cells from stem cells. *Novartis Foundation symposium 265*, 158-167; discussion 167-173, 204-111.

Spits, C., Mateizel, I., Geens, M., Mertzaniidou, A., Staessen, C., Vandeskelde, Y., Van der Elst, J., Liebaers, I., and Sermon, K. (2008). Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. *Nature biotechnology 26*, 1361-1363.

Steel, D., Hyllner, J., and Sartipy, P. (2009). Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells - characteristics and utility for drug discovery. *Current opinion in drug discovery & development 12*, 133-140.

Stojkovic, P., Lako, M., Stewart, R., Przyborski, S., Armstrong, L., Evans, J., Murdoch, A., Strachan, T., and Stojkovic, M. (2005). An autogeneic feeder cell system that efficiently supports growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio) 23*, 306-314.

Strelchenko, N., Verlinsky, O., Kukhareenko, V., and Verlinsky, Y. (2004). Morula-derived human embryonic stem cells. *Reproductive biomedicine online 9*, 623-629.

Strom, S., Inzunza, J., Grinnemo, K.H., Holmberg, K., Matilainen, E., Stromberg, A.M., Blennow, E., and Hovatta, O. (2007). Mechanical isolation of the inner cell mass is effective in derivation of new human embryonic stem cell lines. *Human reproduction (Oxford, England) 22*, 3051-3058.

Sui, Y., Clarke, T., and Khillan, J.S. (2003). Limb bud progenitor cells induce differentiation of pluripotent embryonic stem cells into chondrogenic lineage. *Differentiation; research in biological diversity 71*, 578-585.

Swistowski, A., Peng, J., Han, Y., Swistowska, A.M., Rao, M.S., and Zeng, X. (2009). Xeno-free defined conditions for culture of human embryonic stem cells, neural stem cells and dopaminergic neurons derived from them. *PLoS one 4*, e6233.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell 131*, 861-872.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell 126*, 663-676.

Tarkowski, A.K., and Wroblewska, J. (1967). Development of blastomeres of mouse eggs isolated at the 4- and 8-cell stage. *Journal of embryology and experimental morphology 18*, 155-180.

Taylor, C.J., Bolton, E.M., Pocock, S., Sharples, L.D., Pedersen, R.A., and Bradley, J.A. (2005). Banking on human embryonic stem cells: estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *Lancet 366*, 2019-2025.

Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, NY) 282*, 1145-1147.

Turetsky, T., Aizenman, E., Gil, Y., Weinberg, N., Shufaro, Y., Revel, A., Laufer, N., Simon, A., Abeliovich, D., and Reubinoff, B.E. (2008). Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. *Human reproduction (Oxford, England)* 23, 46-53.

Urbach, A., Schuldiner, M., and Benvenisty, N. (2004). Modeling for Lesch-Nyhan disease by gene targeting in human embryonic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22, 635-641.

van Laake, L.W., Passier, R., den Ouden, K., Schreurs, C., Monshouwer-Kloots, J., Ward-van Oostwaard, D., van Echteld, C.J., Doevendans, P.A., and Mummery, C.L. (2009). Improvement of mouse cardiac function by hESC-derived cardiomyocytes correlates with vascularity but not graft size. *Stem cell research* 3, 106-112.

Vodyanik, M.A., Bork, J.A., Thomson, J.A., and Slukvin, I.I. (2005). Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the coculture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* 105, 617-626.

Wang, Q., Fang, Z.F., Jin, F., Lu, Y., Gai, H., and Sheng, H.Z. (2005). Derivation and growing human embryonic stem cells on feeders derived from themselves. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 23, 1221-1227.

Weissman, I.L., and Shizuru, J.A. (2008). The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood* 112, 3543-3553.

Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J.P., and Jaenisch, R. (2008a). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell stem cell* 2, 10-12.

Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B.E., and Jaenisch, R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448, 318-324.

Wernig, M., Zhao, J.P., Pruszak, J., Hedlund, E., Fu, D., Soldner, F., Broccoli, V., Constantine-Paton, M., Isacson, O., and Jaenisch, R. (2008b). Neurons derived from reprogrammed fibroblasts functionally integrate into the fetal brain and improve symptoms of rats with Parkinson's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 5856-5861.

Wilmut, I., Beaujean, N., de Sousa, P.A., Dinnyes, A., King, T.J., Paterson, L.A., Wells, D.N., and Young, L.E. (2002). Somatic cell nuclear transfer. *Nature* 419, 583-586.

Woltjen, K., Michael, I.P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hamalainen, R., Cowling, R., Wang, W., Liu, P., Gertsenstein, M., *et al.* (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458, 766-770.

Xu, D., Alipio, Z., Fink, L.M., Adcock, D.M., Yang, J., Ward, D.C., and Ma, Y. (2009). Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 808-813.

Xu, C., Inokuma, M.S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J.D., and Carpenter, M.K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 19, 971-974.

Xu, C., Police, S., Rao, N., and Carpenter, M.K. (2002). Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circulation research* 91, 501-508.

Xu, D., Alipio, Z., Fink, L.M., Adcock, D.M., Yang, J., Ward, D.C., and Ma, Y. (2009). Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 808-813.

Yamanaka, S. (2009). A fresh look at iPS cells. *Cell* 137, 13-17.

Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G.M., Hayek, A., and Ding, S. (2006). Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 6907-6912.

Ye, Z., Zhan, H., Mali, P., Dowey, S., Williams, D.M., Jang, Y.Y., Dang, C.V., Spivak, J.L., Moliterno, A.R., and Cheng, L. (2009). Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood* 114, 5473-5480.

Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I., and Thomson, J.A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science (New York, NY)* 324, 797-801.

Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, NY)* 318, 1917-1920.

Zhan, X., Hill, C., Brayton, C.F., and Shamblott, M.J. (2008). Cells derived from human umbilical cord blood support the long-term growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Cloning and stem cells* 10, 513-522.

Zhang, S.C., Wernig, M., Duncan, I.D., Brustle, O., and Thomson, J.A. (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 19, 1129-1133.

Zhang, X.Q., and Zhang, S.C. Differentiation of neural precursors and dopaminergic neurons from human embryonic stem cells. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 584, 355-366.