



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**Célula troncal pluripotencial inducida y su  
aplicación en la medicina regenerativa**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**P R E S E N T A**

**MAYAHUEL MARTÍNEZ MONTES**

**A S E S O R**

**M. en C. ERIK GONZALEZ BALLESTEROS**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO. 2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

UNAM.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

**Célula troncal pluripotencial inducida y su aplicación en la medicina regenerativa**

Que presenta la pasante: **Mayahuel Martínez Montes**  
Con número de cuenta: **310273143** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 03 de junio de 2019.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	QFB. Nydia Berenice González Angeles	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Erik González Ballesteros	
<b>SECRETARIO</b>	QFB. Daniel Raygoza Trejo	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Q. Karla Paola Hernández Pérez	
<b>2do. SUPLENTE</b>	QFB. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg

---

- La ciencia, *muchacho*, está hecha de errores, pero de errores útiles de cometer, pues poco a poco, conducen a la verdad. -

Profesor Otto Lidenbrock  
Viaje al Centro de la Tierra

*Julio Verne (1828-1905)*

## Índice

CONTENIDO		Página
I.	Índice	3
II.	Abreviaturas	4
III.	Introducción	5
1.	Antecedentes de las Células Troncales Pluripotenciales Inducidas	7
1.1	Origen del término “célula troncal”	7
1.2	Método de trasplante de núcleos	7
1.3	Trasplante nuclear en huevos de rana	8
1.4	Clonación	9
1.5	Primer cultivo de células troncales embrionarias	10
1.6	Célula troncal embrionaria	11
1.7	Factores de transcripción OCT4, SOX2, y NANOG	13
2.	Desarrollo de las Células Troncales Pluripotenciales Inducidas	14
2.1	Inducción de células troncales pluripotenciales a partir de fibroblastos de ratones adultos	14
2.2	Inducción de células troncales pluripotenciales a partir de fibroblastos de humanos adultos	18
2.3	Premio Nobel de Medicina 2012	23
3.	Características de las iPSC	24
3.1	Epigenética de las iPSC	26
3.2	Inmunogenicidad de iPSC	27
4.	Metodologías de Obtención de iPSC	29
4.1	Metodología convencional por vectores retrovirales	31
4.2	Reprogramación por vectores virales Sendai	36
4.3	Reprogramación por medio de vectores episomales	37
4.4	Reprogramación por medio de mRNA	37
4.5	Comparación entre metodologías de reprogramación de iPSC	39
5.	Aplicaciones Generales de iPSC	43
5.1	Modelado de enfermedades basado en iPSC	44
5.2	Desarrollo de fármacos basado en iPSC	47
5.3	Reprogramación del cáncer	49
6.	iPSC y su Aplicación en la Medicina Regenerativa	50
6.1	Enfermedades Cardiovasculares	51
6.2	Enfermedades Neurodegenerativas	54
6.3	Inmunodeficiencia	56
6.4	Diabetes	58
7.	Cuestiones Bioéticas y Jurídicas de iPSC	61
7.1	Situación internacional ético-jurídica de CTE y iPSC	61
7.2	Situación ético-jurídica de CTE y iPSC en México	63
8.	Estudios de iPSC en México	65
IV.	Referencias	67

## *Abreviaturas*

bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico
CM	Cardiomiocito
CTE	Célula troncal embrionaria
CTEh	Célula troncal embrionaria humana
CTh	Célula troncal humana
DMR	Regiones metiladas diferenciadas
EBs	Cuerpos Embrioides
GFP	Proteína verde fluorescente
iPSC	Célula troncal pluripotencial inducida
iPSCh	Célula troncal pluripotencial inducida humana
mRNA	RNA mensajero
miRNA	Micro RNA
NK	Natural Killer
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
UV	Luz ultravioleta

## ***Introducción***

Desde que el ser humano tiene conciencia de su cuerpo, ha buscado la manera de comprenderlo y alargar su tiempo de vida, la capacidad de supervivencia y adaptación nos ha dado paso para idear diversas maneras de mejorar nuestra calidad de vida. Hemos usado diversos métodos a lo largo de la historia: rituales religiosos, medicina herbolaria, trasplantes, hábitos de alimentación, entre otros. La salud siempre ha sido uno de los ámbitos más importantes dentro de la sociedad humana, día a día se llevan a cabo estudios sobre posibles soluciones a patologías que acechan nuestro bienestar, ya sean enfermedades infecciosas, inmunológicas, genéticas, crónico degenerativas, traumáticas, etc. Todo con el fin de preservar nuestra vida, como seres humanos.

En la década de 1960 se produjo un cambio radical en el ámbito de la medicina, se reconoció la existencia de varios tipos de linajes celulares provenientes del blastocisto y de la sangre periférica de adultos. Tales células tienen la capacidad de producir nuevos tejidos, inclusive de capas embrionarias. A estas células se les dio el nombre de células troncales o células madre. Para mayor practicidad, en la presente tesis se usará el término “Células troncales” ya que es más usado y aceptado a nivel internacional. Recordando siempre, que la terminología “Células madre” es igualmente válida e incluso es la más usada en el habla hispana.

Las células troncales son un grupo específico de células indiferenciadas que tiene un alto potencial proliferativo, presentan dos características fundamentales: son capaces de autorrenovarse, es decir, de formar células idénticas a la célula de origen, y tiene la capacidad de generar uno o más tejidos celulares que desempeñan funciones especializadas en el organismo (Flores Figueroa, Montesinos, & Mayani, 2006)

Desde que se descubrió el potencial terapéutico de las células troncales embrionarias (CTE), han sido el centro de estudios de medicina regenerativa. En un principio dichos estudios avanzaron de manera gradual, ya que la obtención de estas células caía en una disputa bioética, la fuente más común de obtención era la destrucción de embriones. Por lo cual, desarrollo de las Células Troncales Pluripotenciales Inducidas (iPSCs), por sus siglas en inglés *Induced Pluripotent Stem Cell*, fue un gran paso para la medicina. El Dr. Shinya Yamanaka y su equipo de investigación de la Universidad de Tokio desarrollaron en 2006 dichas células, las cuales fueron tomadas en un principio de fibroblastos de ratones adultos que por la inserción de cuatro factores de reprogramación (Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4) por medio de retrovirus, se logró reprogramarlas a un estado de pluripotencialidad muy similar al de las CTE (Takahashi & Yamanaka, 2006). Posteriormente en 2007 se abordó el mismo procedimiento en células adultas de fibroblastos, pero esta vez de origen humano, dicho desarrollo fue un éxito, las células obtenidas demostraron características similares a células troncales embrionarias humanas, tanto en morfología, proliferación, antígenos de superficie, expresión de genes y actividad de la telomerasa (Takahashi, y otros, 2007).

Con el desarrollo de las iPSC se abrieron vías de investigación, en primer lugar, porque se subsanaban las cuestiones bioéticas, sobre la obtención de células troncales para estudios *in vitro*, al ser células reprogramadas a partir de células ya maduras se evita la destrucción de embriones y las irregularidades del consentimiento informado que esto provocaba. También se abrió una gran brecha en el modelado de enfermedades, desarrollo de fármacos y la medicina regenerativa en conjunto con el tratamiento

específico. En un principio el uso de retrovirus usado para la reprogramación de estas células, representaba una limitación para su aplicación en el ámbito clínico, debido a la integración del material genético de los virus al genoma huésped, por lo cual se han implementado diversas metodologías las cuales han sido clasificadas como integrativas y no integrativas, con ellas se ha tenido una amplia gama de posibilidades de reprogramación, dependiendo del tipo de célula donadora, la aplicación que se le dará y el tipo de célula que se desee obtener a partir de la iPSC (Revilla, y otros, 2015).

A parte de la integración del genoma viral en el paciente, algunas de las desventajas iniciales de las iPSC corresponden a la inmunogenicidad que puedan generar en el paciente, lo que conllevaba el riesgo a desarrollar cáncer, los cambios epigenéticos no controlados que provoca la reprogramación y la baja eficiencia de iPSC obtenidas después la reprogramación, poco a poco se ha ido subsanando algunos aspectos, se han alcanzado eficiencias hasta del 2%, siendo que en el desarrollo inicial de obtuvieron cifras menores al 1% y se han hecho trasplantes de exitosos en primates de tejidos obtenidos a partir de iPSC sin presentar rechazo inmune ni formación de teratomas en el huésped (Schlaeger, y otros, 2015).

Aún falta para que los tratamientos de medicina regenerativa basados en iPSC puedan ser aplicados públicamente sin ningún riesgo, pero no hay duda que el desarrollo de estas células ha iniciado una gran etapa en la medicina. La obtención ilimitada de cualquier tipo de células da posibilidades a efectuar modelado de enfermedades de las cuales anteriormente era imposible obtener una materia biológica a corte al paciente y a su patología, tal es el caso de enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares. Al aumentar la facilidad de obtención de células específicas, los precios del sector salud a tratamientos particulares pudieran ser más accesibles y dejar de ser exclusivos de un sector privilegiado y remunerado.

El presente trabajo tiene como objetivo ofrecer un material básico de referencia para futuras investigaciones, a través de la explicación de los fundamentos, ventajas y desventajas de las diversas técnicas que hasta ahora se han utilizado para la elaboración de iPSC. También es importante mencionar las posibles aplicaciones de esta tecnología, más aún cuando muchas de ellas no han sido culminadas para un tratamiento público y seguro, ya que este tipo de células reprogramadas representan grandes esperanzas para pacientes con múltiples patologías, actualmente incurables.



## ***1.0 Antecedentes de las Células Troncales Pluripotenciales Inducidas***

Con frecuencia la ciencia y la tecnología van de la mano. Casi todos los avances científicos han sido el resultado de nuevos avances tecnológicos. Esto es particularmente ilustrativo en lo referente al descubrimiento de la célula (Garrido Garrido & Barcia González , 2011). Tal es el caso de la elaboración del microscopio que dio paso a la observación de minúsculos mundos o el desarrollo de marcaje por fluorescencia con GFP (green fluorescent protein) que permite la marcación de células específicas. A continuación, se dará un resumen sobre el desarrollo de técnicas y descubrimientos que antecedieron a las células troncales pluripotenciales inducidas (iPSC).

### ***1.1 Origen del término “célula troncal”***

El término *Stem cell* (célula troncal), fue introducido a la literatura científica en 1868 por el reconocido biólogo alemán Ernst Haeckel, que era gran partidario de Charles Darwin y su teoría de la Selección Natural. Así como varias especies provenían de un progenitor en común, en los árboles filogenéticos de Charles Darwin, Haeckel colocó a la célula progenitora de los diversos linajes celulares en la base troncal de su árbol, llamándola *Stammzelle* (célula troncal en alemán). Ernst Haeckel utilizó el término *Stammzelle* dos sentidos: como ancestro unicelular de todos los organismos multicelulares y como el óvulo fertilizado que da lugar a todas las células del organismo. (Ramalho Santos & Willenbring, 2007).

### ***1.2 Método de Trasplante de Núcleos***

Briggs y King realizaron en 1952 una técnica de trasplante de núcleos de células de blástulas avanzadas en huevos anucleados de *Rana pipiens*. Este estudio tuvo como objetivo comprobar directamente si los núcleos de las células embrionarias que se diferencian están o no diferenciados ya con anterioridad. Al reemplazar el núcleo de un huevo por otro núcleo de una célula diferenciada, revelaría el carácter del núcleo trasplantado. Finalmente se demostró que el potencial de diferenciación celular del núcleo, está presente en todo su desarrollo por lo que el núcleo de la blástula de *Rana pipiens* transferido al cigoto enucleado adquiere el potencial de realizar el desarrollo de un embrión.

El método para este trasplante fue:

- ❖ El huevo trasplantado se pincharía con una aguja de vidrio limpia. Esto activa el huevo y hace que gire para que el polo animal esté en la parte superior y el núcleo del huevo se puede extraer con una aguja de vidrio
- ❖ Las capas de gelatina externas se retiran y el huevo se coloca en una depresión en un plato con fondo de cera en la solución de Niu-Twitty.
- ❖ A continuación, se abre una blástula o gástrula temprana colocada en el mismo plato
- ❖ La célula ahora se coloca en la boca de una micropipeta de vidrio de pared delgada
- ❖ A medida que la celda se estira hacia la aguja, se comprime y distorsiona de tal forma que rompe la superficie de la célula sin dispersar el contenido de la celda.

- ❖ La aguja se inserta en el huevo enucleado y se inyecta la célula rota, liberando así el núcleo dentro del huevo.

Al término del experimento se concluyó que el trasplante del núcleo de la blástula fue seguro, siempre y cuando el núcleo sea de la misma especie. Y que tal técnica usada daba paso para estudios en ámbitos de diferenciación y función nuclear. (Briggs & King, 1952).

### ***1.3 Trasplante nuclear en huevos de rana***

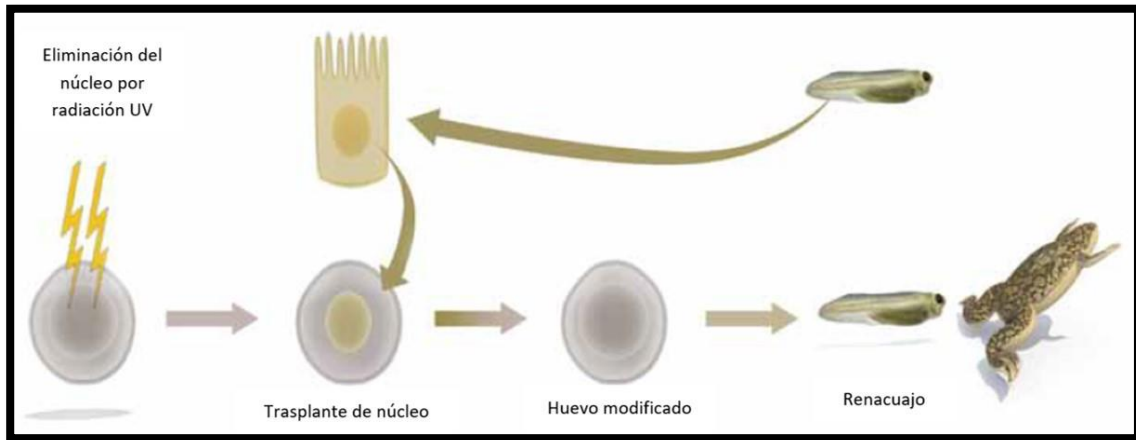
John Bertrand Gurdon nacido el 2 de octubre de 1933 en Inglaterra. Realizó diversos estudios entre 1958 y 1962 respecto al tema de la clonación. Su estudio más conocido se encuentra en su artículo de 1962, sobre la capacidad de desarrollo de núcleos tomados de células del epitelio intestinal de renacuajos (*The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles*).

Inicialmente realizó experimentos para desactivar el núcleo de huevos fertilizados y no fertilizados de rana *Xenopus laevis* por medio de luz UV, ya que esta parecía la manera más confiable y menos dañina para la célula. Y así posteriormente llevar a cabo el proceso de trasplatación nuclear en huevos no anucleados. En dicho estudio se utilizaron huevos fertilizados y huevos no fertilizados, que se expusieron a radiaciones UV con una lámpara Hanovia 100w, los periodos de radiación fueron de 15 a 50 segundos. Los huevos no fertilizados quedaron totalmente inactivados por pequeñas dosis de UV, y el nuevo núcleo trasplantado no presento afectación por radiación o por la muerte del núcleo del huevo. En cuanto los huevos ya fertilizados, solo un 8% mostró anomalías debido a la radiación, dando por concluido el experimento. (Gurdon J. , 1960)

Después de dos años, en diciembre de 1962, Gurdon culminó su estudio de trasplatación nuclear. En dicho año se publicó su artículo, titulado: “*The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles*”. Donde inserto un núcleo proveniente de una célula ya diferenciada del epitelio intestinal de un renacuajo (*Xenopus laevis laevis*). (Ilustración 1) El huevo anucleado fue obtenido por radiación UV con la misma técnica que desarrollo en 1960, con la única diferencia de que el tejido donador fue expuesto a una solución disociadora de Versene (EDTA) durante 30-40 minutos. Las células que se utilizaron para proporcionar los núcleos donantes, fueron células epiteliales ya diferenciadas del intestino medio de renacuajo, su principal característica es que presentaban el borde estriado típico de células con funciones de absorción. La trasplatación nuclear en huevos de rana *Xenopus*, fue basada en los estudios de Briggs y King en 1952. Siendo la principal diferencia entre ambas, la eliminación del núcleo en huevos receptores por medio de radiación UV en vez del uso de una aguja de vidrio para retirarlo como usaron Briggs y King.

De los seis experimentos efectuados, con 379 transferencias nucleares exitosas, se obtuvieron 10 renacuajos normales, con núcleos diploides. A pesar de ser un 1.5% del total de trasferencias efectuadas se demostró que al menos *unas pocas células intestinales diferenciadas contienen núcleos que son capaces de dar lugar a todos los tipos de células necesarios para la formación de un ser completo*. (Gurdon J. , 1962) Los renacuajos obtenidos se convirtieron en ranas adultas y para 1966 Gurdom les realizo pruebas

de fertilidad, dando resultados positivos. (Gurdon J. , 2013) Tales descubrimientos dieron pie a que, en el 2012, junto con el Dr. Shinya Yamanaka, se le galardonara con el Premio Nobel de Medicina.



**Figura 1. Trasplante nuclear en huevos de rana.** John B. Gurdon eliminó el núcleo de una célula huevo de la rana y lo reemplazó con el núcleo tomado de una célula especializada de un renacuajo. El huevo modificado se desarrolló como un renacuajo normal. Tomada de (Covarrubias, 2013)

#### 1.4 Clonación

Dentro de las investigaciones sobre la clonación se distinguen dos tipos según su finalidad; la reproductiva con el objetivo de crear personas idénticas, y la terapéutica que limita a la obtención de embriones y a partir de ellos obtener células madres para tratar enfermedades incurables (González Vidal, García Linares, Leyva Divú, & Rosquete López, 2007).

- En 1996 en el Instituto Roslin de Edimburgo, Escocia el Dr. Ian Wilmut y sus colaboradores hicieron 277 intentos de transferencia nuclear para clonar una oveja variedad *Finn Dorset* “cara blanca”, sólo 29 embriones se activaron los cuales fueron implantados en 13 ovejas “cara negra”; sólo se logró un clon: “Dolly”. Este fue un acontecimiento de gran importancia ya que fue el primer mamífero clonado (Castañeda Partida, 2004).  
Con esta gran hazaña, se demostró que los factores acumulados en el citoplasma de óvulo (ovoplasma) son capaces de reprogramar el núcleo de una célula diferenciada para convertirlo en un núcleo adecuado al de una célula troncal embrionaria (Gazarian , 2013).
- La última gran noticia sobre esta rama de la ciencia fue en enero del 2018 a causa del nacimiento de dos pequeños monos (*Macaca fascicularis*). Esto ocurrió en el Instituto de Neurociencias de la Academia Nacional de Ciencias, China, donde se llevó a cabo usando un método por transferencia nuclear de fibroblastos de mono fetal. Se confirmaron 6 embarazos en 21 sustitutos y se obtuvieron 2 bebés sanos (Zhen, y otros, 2018).

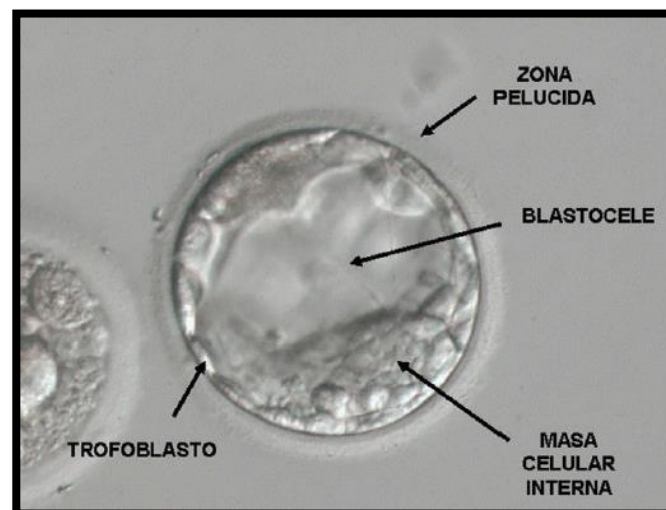
A pesar de los diversos avances, aún no se considera lo suficiente para empezar la clonación en humanos. Los investigadores Ricardo Tapia del Instituto de Fisiología Celular y Horacio Merchant Larios del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, afirman lo siguiente:

*Se han hecho experimentos no para clonar humanos, sino para generar blastocistos (estructuras que se implantan en el útero y contienen las células madre embrionarias) que se podrían diferenciar en distintos tejidos in vitro, y generar células destinadas a desplazar las que se mueren por enfermedades degenerativas. Y aplicar a humanos, técnicas que se han hecho tanto en borregas y monos, sería prácticamente imposible (Merchant Larios & Tapia Ibarguengoytia, 2018).*

### **1.5 Primer cultivo de células troncales embrionarias**

El 6 de noviembre de 1998 el biólogo estadounidense James Alexander Thomson, junto con su equipo de trabajo, publicaron el artículo “*Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocyst*” donde demostraron haber logrado cultivar por primera vez células troncales humanas, que podían mantenerse cierto tiempo sin diferenciarse (Guerrero Mothelet, 2004).

Los embriones usados durante el experimento, se cultivaron en la etapa de blastocisto (Figura 2), se aislaron 14 masas celulares internas y se derivaron cinco líneas de células troncales procedentes de cinco embriones diferentes. Cada una de las líneas celulares fue crioconservada y descongelada con éxito. Cuatro de las líneas celulares se crioconservaron, aun después de 5 a 6 meses de proliferación continúa indiferenciada. Y la otra línea celular, después de 6 meses de cultivo fue sometida a pases continuos (32 pases) durante 8 meses. (Thomson, y otros, 1998)



**Figura 2. Blastocisto humano.** Se detallan las diferentes partes del mismo, destacando la masa celular interna, de donde se obtiene células troncales embrionarias humanas (CTEh). Tomada de (Cortés & García Pérez, 2011)

Aun así, estas líneas celulares troncales embrionarias humanas (CTEh) expresaron altos niveles de actividad de telomerasa y marcadores de membrana propios de células troncales embrionarias, tales como el antígeno embrionario específico de estadio. De igual manera las líneas celulares, mantuvieron el potencial para formar derivados de las tres capas germinales embrionarias. (Thomson, y otros, 1998)

## ***1.6 Célula Troncal Embrionaria***

A pesar de la existencia de estudios pasados sobre las células troncales, fue hasta la publicación del trabajo de James Thomson sobre la aislación y cultivo de dichas células que comenzó su potencial popularidad. Las razones de este auge son evidentes: la potencialidad biomédica de la utilización de las células troncales embrionarias para la terapia celular de diversas enfermedades humanas y un mayor conocimiento de los procesos moleculares de las enfermedades inmunes, oncogénicas, crónico degenerativas, etc.

Se entienden como células troncales embrionarias aquellas que: a) provienen de un blastocito obtenido por técnicas de fecundación in vitro. b) tienen la capacidad de dividirse indefinidamente sin diferenciarse. c) conservan la propiedad estable de diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales (ectodermo, endodermo y mesodermo), aún después de un prolongado periodo de cultivo (Gámez Escalona J. A., 2013). Las células troncales pueden clasificarse por su origen o por su capacidad de diferenciación. (Cuadro 1 y 2)

***Cuadro 1. Clasificación de células troncales por su origen.***

<b><i>Clasificación de células troncales por su origen</i></b>
<b>Células troncales adultas:</b> también conocidas como órgano específicas, ya que generan los tipos celulares del mismo tejido
<b>Células troncales embrionarias:</b> dichas células provienen de embriones y actualmente se conoce 3 tipos de fuentes para su obtención. a) embriones que no llegaron a utilizarse en los procedimientos de fertilización in vitro, b) embriones creados de células somáticas por técnicas de transfección c) líneas de células troncales embrionarias ya existentes, las cuales se obtienen de cultivos celulares.
<b>Células troncales pluripotenciales inducidas:</b> conocidas como iPSC por sus siglas en inglés, son células troncales modificadas, se desarrollaron en 2006 a partir de células adultas ya diferenciadas que mediante la inserción de genes de pluripotencialidad son capaces de volver a un estado de célula troncal.

Modificado de: (Mata Miranda , Vázquez Zapién, & Sánchez Monroy, 2013)

Cuadro 2. Clasificación de células troncales por su capacidad de diferenciación.

Clasificación de células troncales por capacidad de diferenciación	
<b>Totipotenciales.</b>	Únicamente el cigoto y las descendientes de las dos primeras divisiones son células totipotenciales ya que tiene la capacidad de formar tanto el embrión como el trofoblasto de la placenta.
<b>Pluripotenciales.</b>	A los cuatro días las células totipotenciales empiezan a diferenciarse, formando el blastocisto y la masa celular interna. Las células de la masa celular interna son consideradas pluripotenciales y pueden diferenciarse en las tres líneas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), pero pierden la capacidad de formar la placenta.
<b>Multipotenciales.</b>	Son células capaces de producir un rango limitado de linajes de células diferenciadas de acuerdo a su localización.
<b>Unipotenciales.</b>	Son células capaces de generar un solo tipo de células específica.

Modificado de: (Mata Miranda , Vázquez Zapíen, & Sánchez Monroy, 2013)

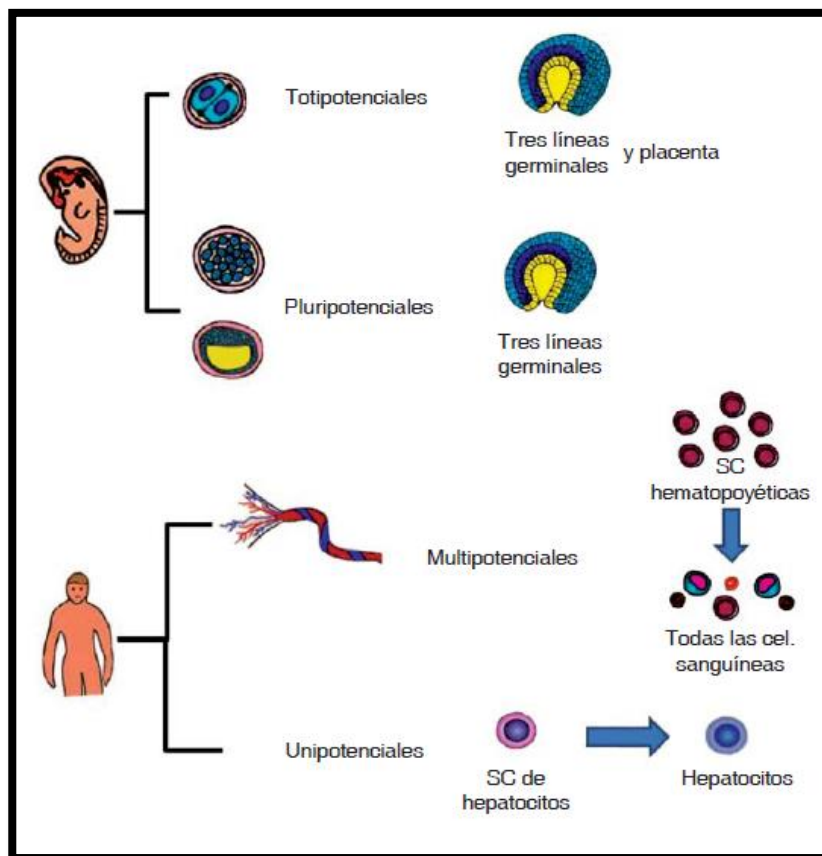


Figura 3. Clasificación de células troncales por tu capacidad de diferenciación. Tomada de (Mata Miranda , Vázquez Zapíen, & Sánchez Monroy, 2013)

## 1.7 Factores de transcripción OCT4, SOX2, y NANOG

En el 2005, Boyer y sus colaboradores identificaron que los factores de transcripción OCT4, SOX2 y NANOG, son necesarios para la propagación de células troncales embrionarias indiferenciadas, en cultivo. Y que también participan en circuitos reguladores que consisten en autorregulación y bucles *feed-forward*.

El experimento fue llevado a cabo con técnicas de inmunoprecipitación de cromatina junto con micro rayas de DNA, para identificar los genes objetivos de los tres reguladores (OCT4, SOX2 y NANOG) *in vivo*. Determinando que el gen OCT4 tiene sitios de unión en 623 genes; el SOX2, en 1271; NANOG en 1687, y todos juntos en 353 genes. Concluyendo que estos genes ayudan a la pluripotencialidad y autorrenovación.

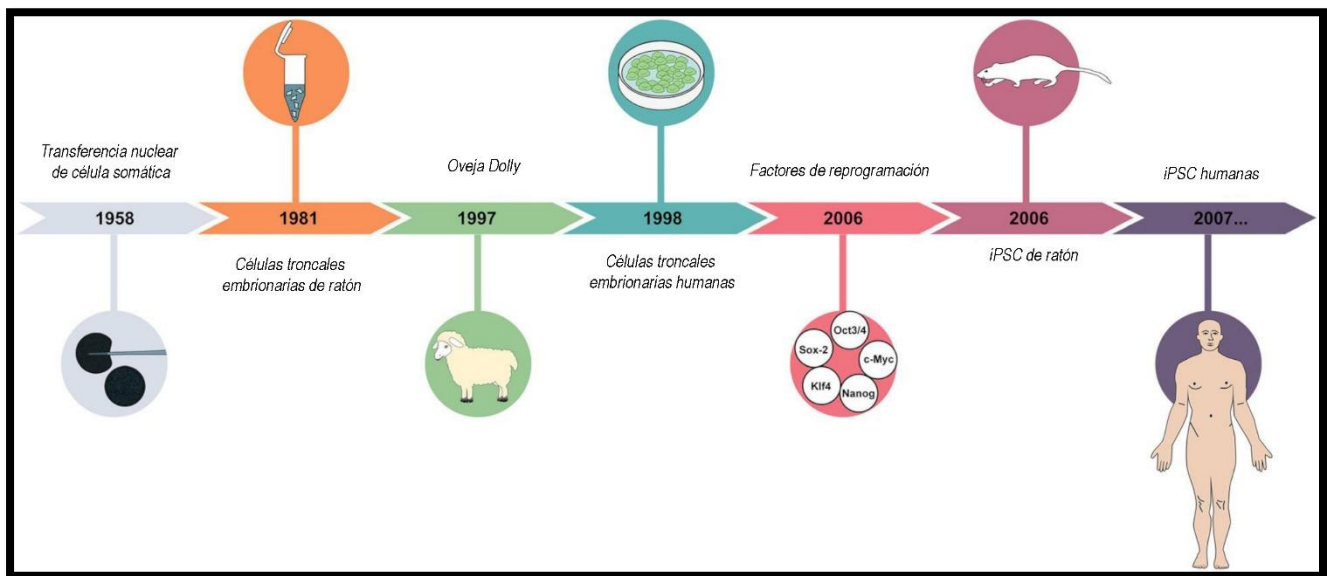


Figura 4. Desarrollo histórico de las iPSC. Tomada de (Abou Saleh, y otros, 2018)

## ***2.0 Desarrollo de las Células Troncales Pluripotenciales Inducidas***

Las células troncales embrionarias (CTE), derivadas de la masa celular interna de los blastocistos de mamíferos, tienen la capacidad de crecer indefinidamente mientras mantienen la pluripotencialidad (Evans & Kaufman, 1981). Estas propiedades llevaron a la expectativa de que las células troncales humanas (CTh) podrían ser útiles para comprender los mecanismos de la enfermedad, detectar medicamentos seguros y tratar a pacientes con diversas enfermedades y lesiones (Thomson, y otros, 1998). El uso de embriones humanos, sin embargo, enfrenta controversias éticas que obstaculizan las aplicaciones de las CTh. Además, es difícil generar CTh específicas para el paciente o la enfermedad, que se requieren para su aplicación efectiva. Una forma de evitar estos problemas es inducir el estado pluripotente en células somáticas maduras mediante la reprogramación directa (Takahashi, y otros, 2007).

A mitad del año de 2006 Shinya Yamanaka y Kazutoshi Takahashi de la universidad de Tokio, demostraron el logro de la reprogramación en células somáticas ya diferenciadas de ratón (fibroblastos) por medio de la introducción de cuatro factores, Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4. Las células resultantes fueron llamadas células troncales pluripotenciales inducidas (iPSC). Tales cultivos mostraron morfología, propiedades de crecimiento, marcadores celulares similares de células troncales y la capacidad de diferenciarse en tipos de células de las tres capas germinales primarias, ectodermo, mesodermo y endodermo (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Para el 2007 Shinya Yamanaka y su equipo abordaron un procedimiento similar, pero en células humanas. Los fibroblastos humanos fueron sometidos a la misma introducción de los 4 factores de reprogramación. Las células resultantes eran similares a las células troncales embrionarias (CTE) en morfología, proliferación, antígenos de superficie, expresión génica, estado epigenético y actividad de la telomerasa. Además, estas células también podían diferenciarse en células de las tres capas germinales (Takahashi & Yamanaka 2007).

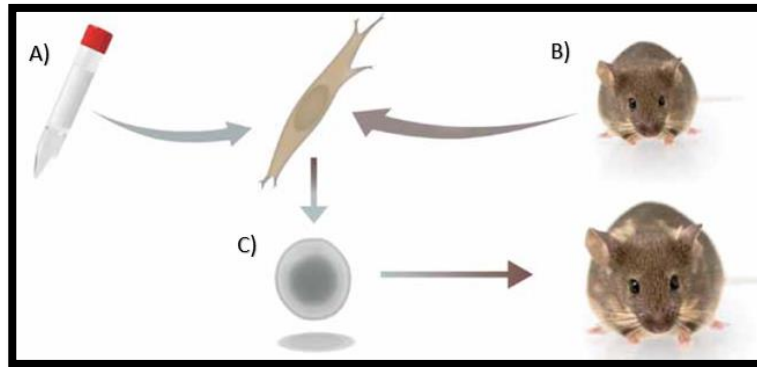
Estos descubrimientos tuvieron una importante repercusión, la producción de iPSC fue considerada como el hallazgo más importante de la década por la prestigiosa revista estadounidense *Science*. Se comenzó la creación de líneas celulares basadas en iPSC tanto con enfoques para la medicina regenerativa, el desarrollo de medicamentos específicos y modelado de enfermedades. Fue un gran paso para evitar las disputas éticas sobre la obtención de células troncales humanas, ya que anteriormente la fuente más común era la destrucción de embriones (Cortés & García Pérez, 2011).

### ***2.10 Inducción de células troncales pluripotenciales de ratón embrionario y cultivos de fibroblasto adulto por factores definidos***

El desarrollo de las iPSC a partir de fibroblastos de ratón, se publicó en Julio del 2006, en la revista *Science*, el artículo de Shinya Yamanaka y Kazutoshi Takahashi, el cual lleva por título: “Inducción de

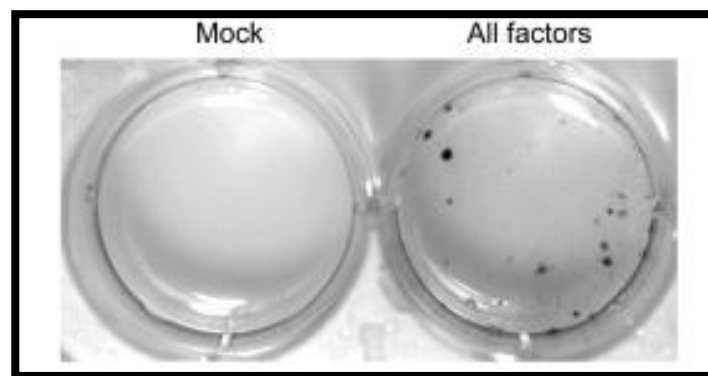


Células Troncales Pluripotenciales de Ratón Embrionario y Cultivos de Fibroblasto Adulto por Factores Definidos” (*Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors*) es la evidencia inicial de la posibilidad de reprogramar células somáticas ya maduras a un estado embrionario por medio de la introducción únicamente de cuatro factores de reprogramación. (Figura 5)



**Figura 5. Reprogramación de células somáticas ya maduras de ratón a un estado de pluripotencialidad.** A) Transferencia de factores de reprogramación a B) células maduras de ratón que C) fueron reprogramadas en células iPSC que podrían convertirse en linajes celulares de un ratón adulto. Tomada de (Covarrubias, 2013)

Inicialmente se seleccionaron 24 posibles genes promotores de pluripotencialidad. Para identificar los genes afines, desarrollaron un sistema en el cual el estado de pluripotencialidad podía detectarse como la resistencia al antibiótico G418. Se introdujeron cada uno de los genes candidatos dentro de fibroblastos embrionarios de ratón por medio de transducción retroviral. Las células transducidas se cultivaron luego en células troncales embrionarias que contenían G418. Sin embargo, no se obtuvieron colonias resistentes al medicamento con un solo factor. En cambio, cuando se realizó a transducción de los 24 candidatos juntos se generaron 22 colonias resistentes a G418 (Figura 6).

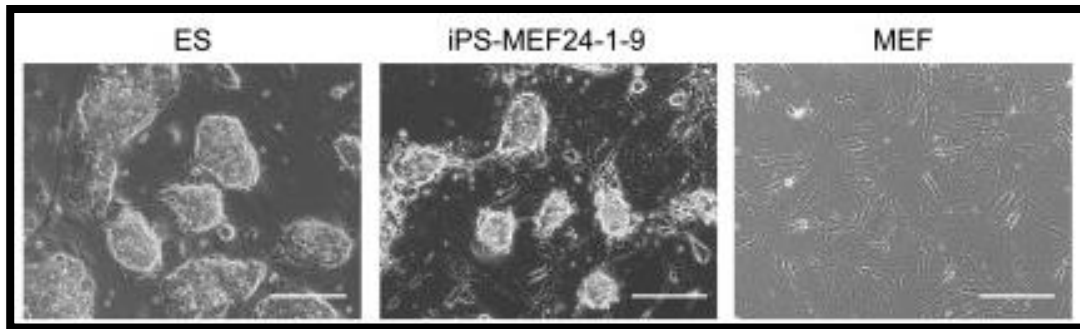


**Figura 6. Colonias G418-resistentes,** observadas 16 días después de la transducción. Con una combinación de los 24 factores. Tomada de (Takahashi & Yamanaka, 2006)

De las colonias resistentes a G418 obtenidas, se seleccionaron 6 colonias. Estas poseían propiedades de morfología y proliferación de tipo troncal embrionaria. El tiempo de duplicación de estas células fue

equivalente al de las células troncales embrionarias (17.0 h). Por medio de PCR de transcripción inversa, se reveló que dichas células expresaban marcadores de células troncales embrionarias, incluidos Oct3 / 4, Nanog, E- Ras, Cripto, Dax1 y Zfp296 y Fgf4 (Mitsui, y otros, 2003). Estos datos indicaron que alguna combinación de esos 24 factores inducía la expresión de los genes de células troncales embrionarias en el cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón.

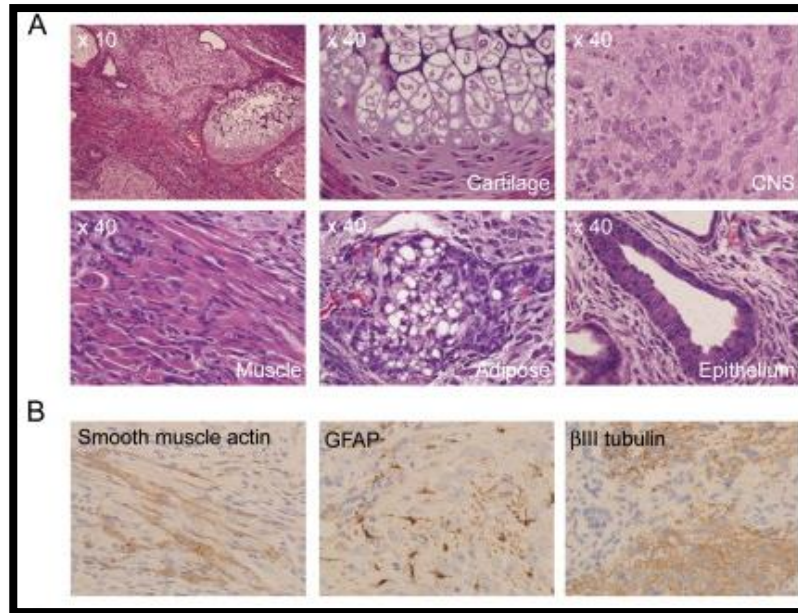
Se realizaron diversas combinaciones con 10 factores prospectos para la inducción. Las colonias resistentes a G418 no se formaron cuando se eliminó Oct3 / 4 o Klf4. La eliminación de Sox2 dio como resultado solo unas pocas colonias resistentes a G418. Cuando eliminaron c-Myc, surgieron colonias resistentes a G418, pero éstas tenían una morfología más plana, no parecida a una CTE. La eliminación de los factores restantes no afectó significativamente el número de colonias. Demostrando que Oct3 / 4, Klf4, Sox2 y c-Myc desempeñan roles importantes en la generación de iPSC (Figura 7).



*Figura 7. Morfologías celulares. De izquierda a derecha, células troncales, iPSC Y fibroblastos embrionarios de ratón. Escala BARS = 200  $\mu$ m. Tomada de (Takahashi & Yamanaka, 2006)*

A parte de estas comparaciones morfológicas, se realizaron otros estudios como secuencia genómica de bisulfito, inmunoprecipitación de cromatina, prueba de fosfatasa alcalina, detección de la actividad de la telomerasa y comparación de los perfiles globales de expresión génica de células troncales embrionarias, iPSC y fibroblastos embrionarios de ratones, utilizando microarrays de DNA. Dichas pruebas confirmaron que las iPSC son similares, pero no idénticas, a las células troncales embrionarias.

Para examinar la pluripotencialidad de las iPSC se indujo un teratoma por medio de una inyección subcutánea de iPSC en ratones desnudos. El examen histológico reveló que algunas de las células utilizadas, se diferenciaron en las tres capas germinales, incluidos los tejidos neurales, el cartílago y el epitelio columnar y mediante inmunotinción, se confirmó la diferenciación en tejidos neurales y musculares (Figura 8). Mediante esto se concluyó que, aun teniendo factores propios de células troncales embrionarias, no todas las iPSC eran capaces de formar células de las tres capas embrionarias (Takahashi & Yamanaka, 2006).



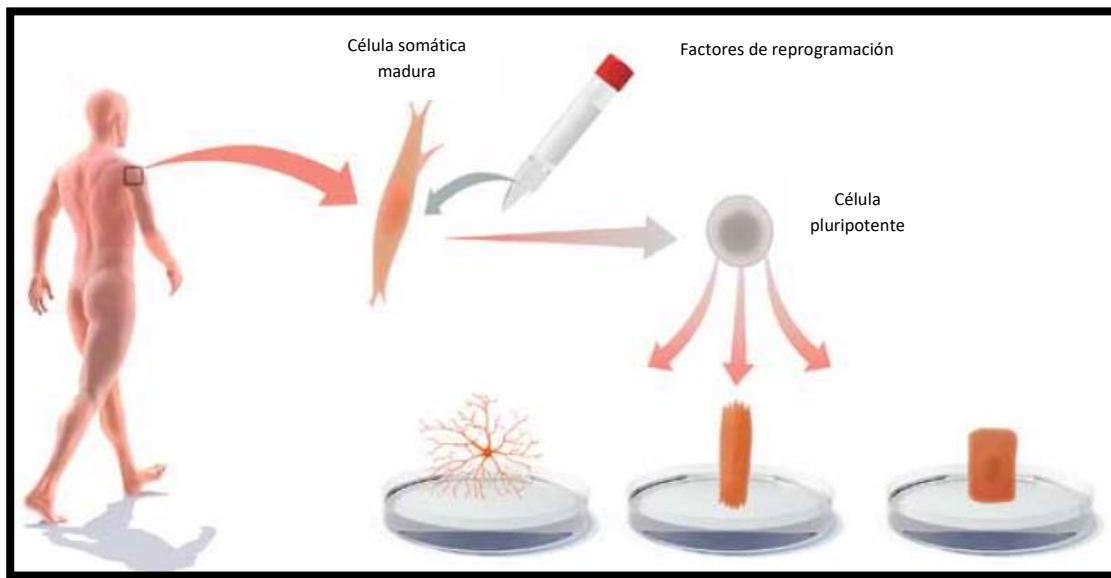
**Figura 8. Tejidos derivados de teratoma de iPSC** A) Tejidos presentes en teratomas derivados de iPSC, tinción hematoxilina eosina. B) Inmunotinción que confirma la diferenciación en tejidos y músculos neurales en teratomas derivados de iPSC. Tomada de (Takahashi & Yamanaka, 2006)

De este primer desarrollo de células troncales pluripotenciales inducidas a partir de fibroblastos de ratón, se concluyó:

- Oct3 / 4, Sox2 y Nanog funcionan como factores de transcripción principales para mantener la pluripotencia, en especial Oct3 / 4 y Sox2 son esenciales para la generación de iPSC.
- Y la proteína c-Myc puede inducir la acetilación global de histonas (Fernandez, y otros, 2003), lo que permite que Oct3 / 4 y Sox2 se unan a sus loci objetivos específicos.
- Klf4 reprime p53 directamente (Rowland, Bernards, & Peepers, 2005), y se ha demostrado que la proteína p53 suprime a Nanog durante la diferenciación de células troncales embrionarias (Lin, y otros, 2005). Por lo tanto, Klf4 podría contribuir a la activación de Nanog y otros genes específicos de CTE a través de la represión de p53.
- Klf4 podría funcionar como un inhibidor de la apoptosis inducida por Myc a través de la represión de p53 en nuestro sistema. El equilibrio entre c-Myc y Klf4 puede ser importante para la generación de iPSC.
- Se demostró que las iPSC pueden diferenciarse in vitro e in vivo incluso con la presencia de los vectores retrovirales que contienen los cuatro factores.
- El uso de c-Myc puede no ser adecuado para aplicaciones clínicas, y el proceso puede requerir entornos de cultivo específicos. Sin embargo, el descubrimiento es un paso importante para controlar la pluripotencia, que eventualmente puede permitir la creación de células pluripotentes directamente a partir de células somáticas de pacientes (Takahashi & Yamanaka, 2006).
- Por medio de la introducción de los cuatro factores en una célula somática ya diferenciada, es posible la reprogramación de la célula a un estado pluripotencial.

## 2.2 Inducción de células troncales pluripotenciales de fibroblastos de humanos adultos por factores definidos

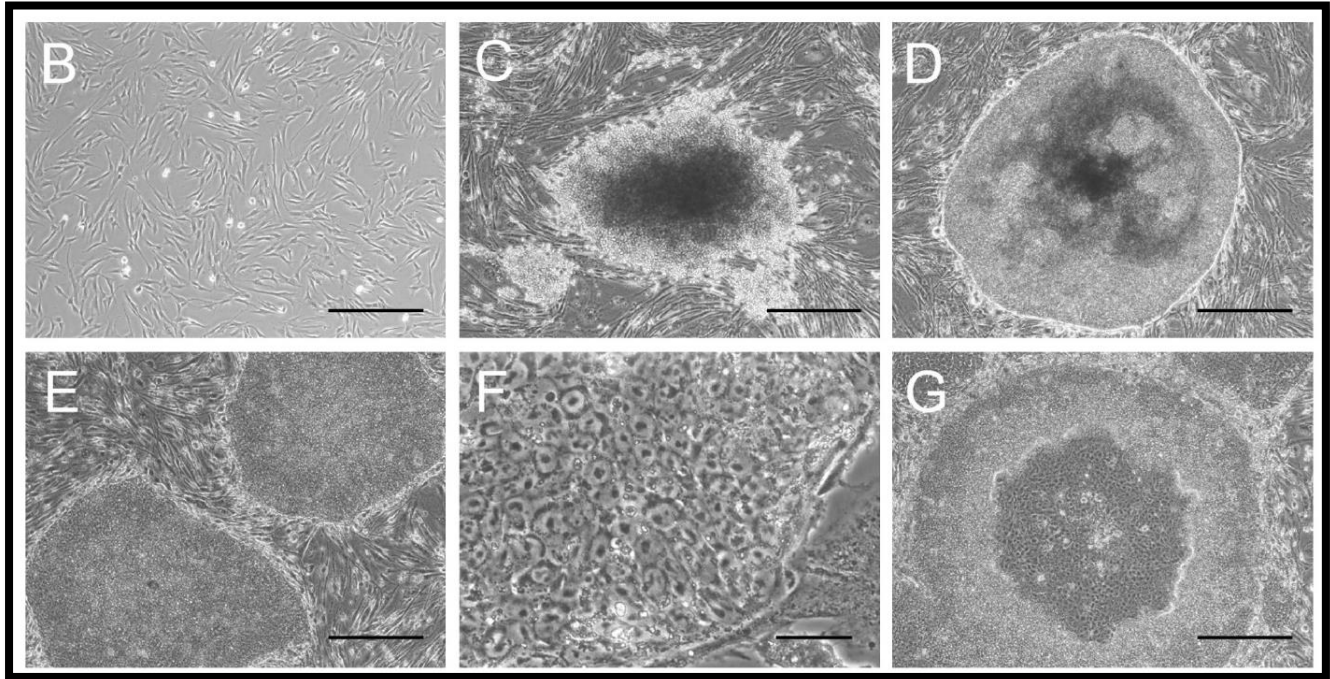
Seguido de la reprogramación de fibroblastos de ratón, el equipo del Dr. Shinya Yamanaka abordó la reprogramación en fibroblastos humanos, por medio de los mismos cuatro factores de reprogramación usados con fibroblastos de ratón, (Oct3 / 4, Sox2, Klf4 y c-Myc). En noviembre del 2007 se publicó un artículo nombrado “Inducción de células troncales pluripotenciales de fibroblastos humanos adultos por factores definidos” (Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors) (Takahashi, y otros, 2007). Dando apertura a una posible aplicación clínica en el ámbito de la medicina regenerativa, desarrollo de fármacos y modelado de enfermedades (Figura 9).



**Figura 9. Generación de iPSC a partir de células humanas.** A través de una célula humana ya madura, se puede inducir la reprogramación a un estado embrionario por medio de 4 factores de reprogramación. Al tener una célula pluripotente, está se puede programar a cualquier tipo de linaje celular. Tomada de (Covarrubias, 2013)

Para la generación de iPSC se introdujeron retrovirus que contenían los factores de reprogramación Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc en Fibroblastos Dérmicos Humanos (Figura 10.B), derivados de la dermis facial de una mujer caucásica de 36 años. Seis días después de la transducción, las células se recogieron mediante tripsinización y se colocaron en placas sobre SNL Feeder Cell tratadas con mitomicina C. Al día siguiente, el medio DMEM (que contenía suero fetal bovino al 10%) se reemplazó con medio para cultivo de células madre embrionarias de primate suplementado con 4 ng / ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF). Aproximadamente dos semanas después, aparecieron algunas colonias granuladas que no eran similares a las CTEh en la morfología (Figura 10.C). Alrededor del día 25, se observaron distintos tipos de colonias que eran planas y ya presentaban un parecido a colonias de CTEh (Figura 10.D). En el día 30, se seleccionaron las colonias similares a CTEh y se disgregaron mecánicamente en pequeños grupos sin digestión enzimática. Ocasionalmente se observaron algunas colonias de tipo CTEh entre las células granuladas. Las células similares a CTEh se expandieron en SNL Feeder Cell, con medio para cultivo de células madre embrionarias de primate que contenía bFGF.

Formaron colonias compactas y planas (Figura 10.E). Cada célula exhibió una morfología similar a la de las CTEh, caracterizada por grandes núcleos y escaso citoplasma (Figura 10.F). Como ocurre con las CTEh, en ocasiones observamos una diferenciación espontánea en el centro de la colonia (Figura 10.G).

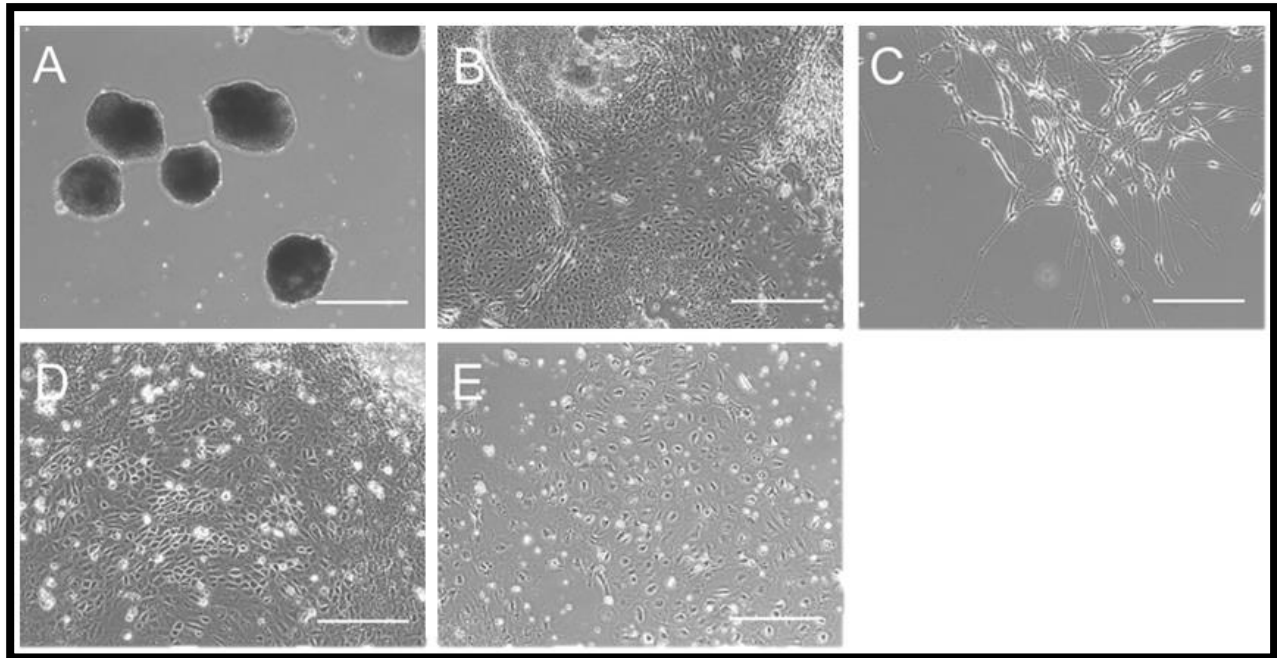


**Figura 10. Proceso morfológico de reprogramación de iPSC.** B) Morfología de Fibroblastos Dérmicos Humanos; C) Colonias similares a CTE; D) Colonia de CTEh, E) Morfología similar a iPSC; F) Células iPSC; G) Células diferenciadas espontáneamente en la parte central de las colonias de células iPSC humanas. Tomada de (Takahashi, y otros, 2007)

A las iPSC obtenidas, se les realizaron diversas técnicas, para comparar sus características moleculares con células Troncales Embrionarias. De tales comparaciones se obtuvo que: las iPSC, en general no expresaron antígeno embrionario específico de estadio 1 o SSEA-1 (por sus siglas en inglés de: stage-specific embryonic antigen) pero sí antígenos de superficie específicos de CTEh, entre ellos: *SSEA-3* y *SSEA-4*. La RT-PCR mostró que las iPSC expresaron muchos genes marcadores de CTE no diferenciados (Adeyemi et al., 2007), como OCT3 / 4, SOX2, NANOG, factor de crecimiento y diferenciación 3 (GDF3), factor de crecimiento de fibroblastos 4 (FGF4), gen específico de células embrionarias 1 (ESG1), pluripotencia asociada al desarrollo 2 (DPPA2), y telomerasa transcriptasa inversa (hTERT).

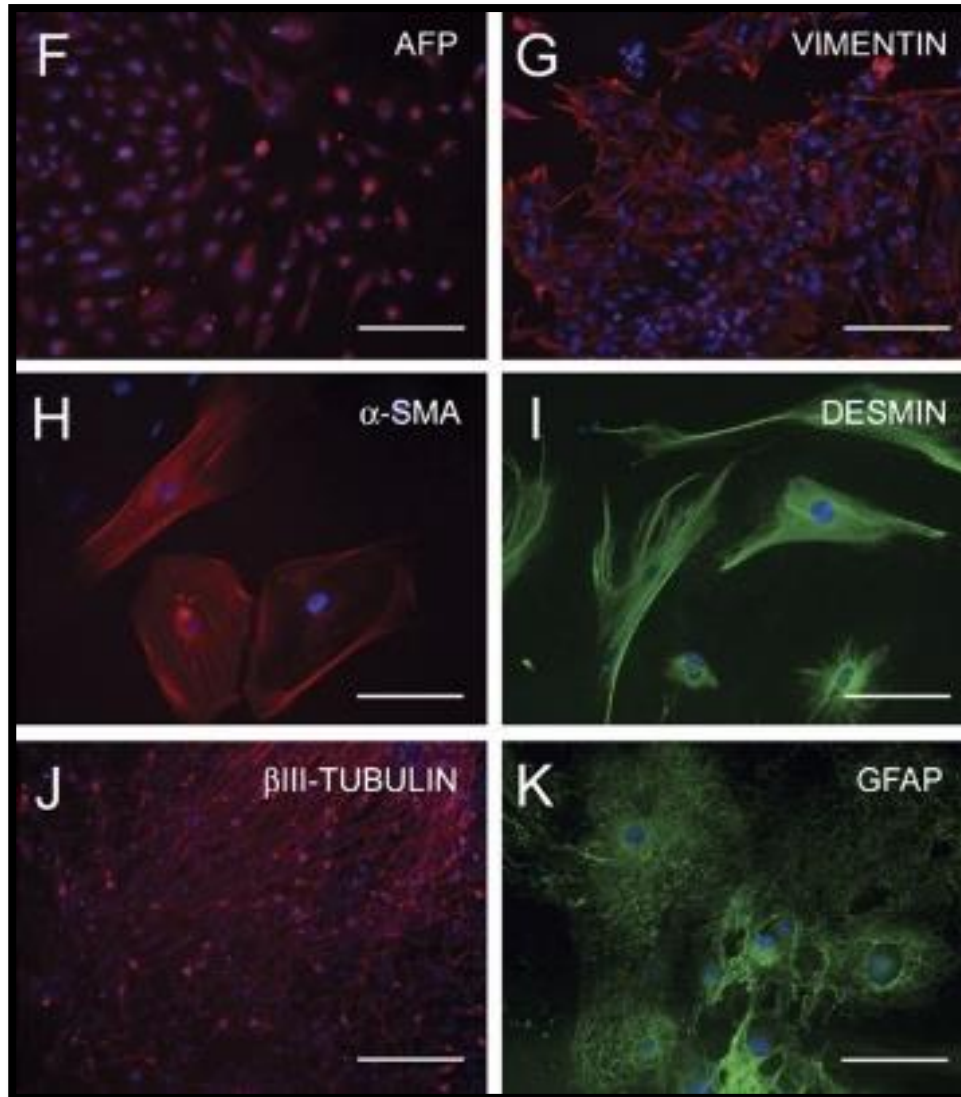
Por otra parte, la RT-PCR confirmó el silenciamiento eficiente de los retrovirus. Los análisis de micromatrices de DNA mostraron que los patrones globales de expresión génica de las iPSC son similares, pero no idénticos a las CTEh, de igual manera los análisis de secuenciación genómica de bisulfito, ensayos de indicadores de luciferasa e inmunoprecipitación de cromatina, confirmaron que tanto las iPSC y CTEh expresan actividades y estados moleculares parecidos. Las iPSC humanas también mostraron una alta actividad de la telomerasa y una proliferación exponencialmente durante al menos 4 meses, con tiempos equivalentes al tiempo de duplicación reportado de las CTEh (Cowan, y otros, 2004).

Para determinar la capacidad de diferenciación de las iPSC humanas in vitro, se utilizó un cultivo flotante para formar cuerpos embrioides (EBs) (Itskovitz-Eldor et al., 2000). Después de 8 días en el cultivo en suspensión, las iPSC formaron estructuras en forma de bola (Figura 11.A). De transfirieron estas estructuras de cuerpo embrionario a placas recubiertas de agar y se continuo el cultivo durante otros 8 días. Las células adheridas mostraron varios tipos de morfologías (Figuras 11.B a 11.E).



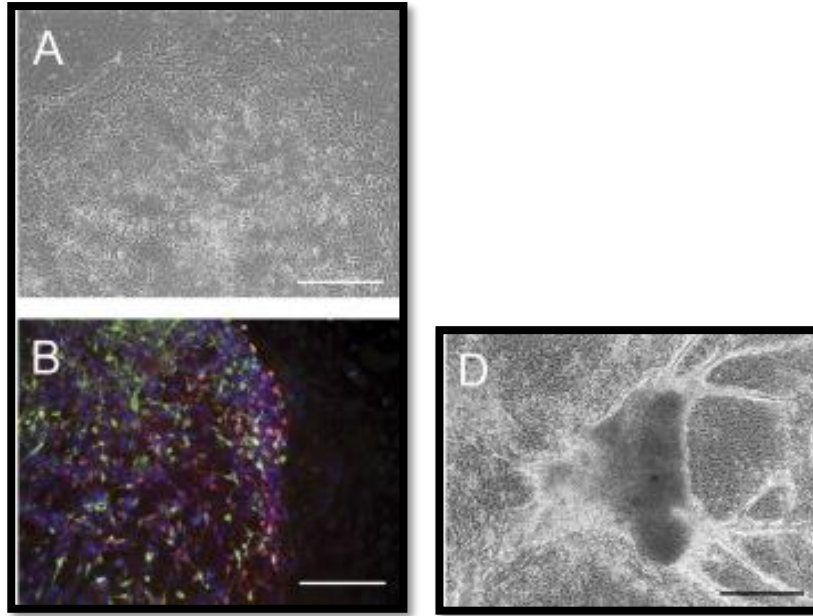
**Figura 11. Diferenciación de iPSC humanas.** A) Cultivo flotante de iPSC al día 8; B) Células diferenciadas al día 16; C) Morfología parecida a células neuronales; D) Morfología parecida a células epiteliales; E); Morfología de adquinas celulares. Tomada de (Takahashi, y otros, 2007)

Otra manera de comprobar la capacidad de diferenciación, fue por medio de la técnica de inmunocitoquímica, se encontraron marcadores específicos de células ya diferenciadas en iPSC medianamente diferenciadas. Entre ellos:  $\beta$ III-tubulina (un marcador de ectodermo), proteína ácida fibrilar glial (GFAP, ectodermo), actina del músculo liso  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA, mesodermo), desmina (mesodermo),  $\alpha$ -fetoproteína (AFP, endodermo), y vimentina (mesodermo y endodermo parietal) (Figuras 12 F a K). Con esto se demostró que las iPSC podrían diferenciarse en tres capas germinales in vitro.



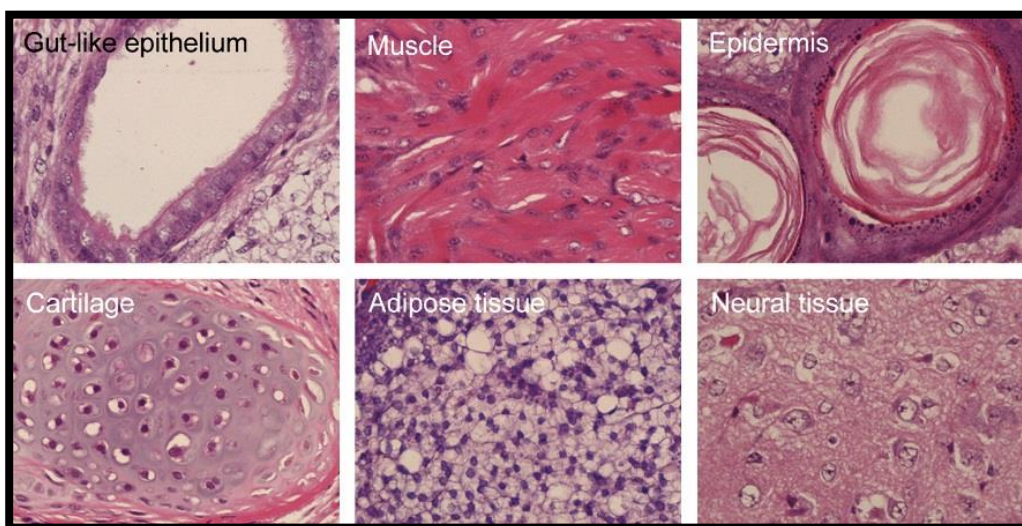
**Figura 12. Inmunohistoquímica en iPSCs medianamente diferenciadas.** F)  $\alpha$ -fetoproteína; G) Vimentina; H)  $\alpha$ -actina de musculo liso; I) Desmina; J)  $\beta$ III-tubulina; K) proteína fibrilar ácida de la glial. Tomada de (Takahashi, y otros, 2007)

También se realizó una diferenciación dirigida, de iPSCs en células neurales y cardiomiocitos. En la diferenciación neural, se sembraron iPSCs en placas que se mantuvieron bajo condiciones de diferenciación durante 2 semanas. Las células se diseminaron drásticamente y se observaron algunas estructuras neuronales (Figura 13.A) y la inmunocitoquímica detectó células positivas para tirosina hidroxilasa y tubulina  $\beta$ III en el cultivo (Figura 13.B). En la diferenciación de cardiomiocitos, las iPSCs se mantuvieron 12 días en diferenciación antes de que comenzaran a latir. (Figura 13.D) La RT-PCR mostró que estas células expresaban marcadores de cardiomiocitos, tales como la troponina T tipo 2 cardíaca (TnTc), músculo cardíaco, beta (MYHCB). Por lo tanto, las iPSCs humanas pueden diferenciarse en neuronas, incluso neuronas dopaminérgicas y cardiomiocitos cardíacos in vitro (Takahashi, y otros, 2007).



**Figura 13. Diferenciación de iPSCs en neuronas y cardiomiocitos.** A) Estructuras neuronales derivadas de iPSCs después de 8 días de cultivo. B) Inmunocitoquímica de iPSCs diferenciadas en estructuras neuronales, rojo → anticuerpos de b3-tubulina, verde → tirosina hidroxilasa y azul → núcleo. D) iPSCs diferenciadas en cardiomiocitos. Tomada de (Takahashi, y otros, 2007)

Para probar la pluripotencialidad in vivo de las iPSCs, se trasplantaron por vía subcutánea en los flancos dorsales de ratones inmunodeficientes (SCID). Nueve semanas después de la inyección, se observó la formación de tumores. El examen histológico mostró que el tumor contenía varios tejidos (Figura 14), incluidos tejidos epiteliales de tipo intestinal (endodermo), músculo estriado (mesodermo), cartílago (mesodermo), tejidos neurales (ectodermo) y tejidos epidérmicos que contienen queratina (ectodermo).



**Figura 14. Diferentes tejidos derivados de teratomas formados por la inyección subcutánea de iPSCs en ratones inmunodeficientes.** Tomada de (Takahashi, y otros, 2007)



Las conclusiones al primer desarrollo de las iPSCs fueron:

- ❖ Las iPSCs pueden generarse a partir de fibroblastos dérmicos humanos adultos y otras células somáticas, por transducción retroviral de los mismos cuatro factores de transcripción usados con iPSC de ratón, (Oct3 / 4, Sox2, Klf4 y c-Myc).
- ❖ Las iPSC humanas establecidas son similares a las células TEH en muchos aspectos, incluida la morfología, la proliferación, los marcadores de superficie, la expresión génica, las actividades promotoras, actividad de la telomerasa, la diferenciación in vitro y la formación de teratoma.
- ❖ Los retrovirus usados están fuertemente silenciados en iPSCs, lo que indica que estas células están reprogramadas de manera eficiente.
- ❖ Se sugiere que la red de transcripción fundamental que gobierna la pluripotencialidad es común en humanos y ratones, pero los factores y señales extrínsecos que mantienen la pluripotencialidad son únicos para cada especie.
- ❖ Descifrar el mecanismo por el cual los cuatro factores inducen la pluripotencia en células somáticas sigue siendo difícil de alcanzar. Se especula que c-Myc y Klf4 modifican la estructura de la cromatina para que Oct3 / 4 y Sox2 puedan unirse a sus objetivos. En particular, Klf4 interactúa con la histona acetil-transferasa p300 y regula la transcripción de genes mediante la modulación de la acetilación de histonas (Evans et al., 2007).
- ❖ El riesgo de integraciones retrovirales en las iPSC puede aumentar el riesgo de tumorigénesis.
- ❖ Desde un punto de vista práctico, la eficiencia de células obtenidas es suficientemente alta, ya que se pueden obtener múltiples clones de iPSC a partir de un solo experimento.
- ❖ Este estudio ha abierto una vía para generar células madre pluripotentes específicas para pacientes y enfermedades. Incluso con la presencia de integración retroviral, las iPSC humanas son útiles para comprender los mecanismos de la enfermedad, la detección de drogas y la toxicología.
- ❖ Una vez que se haya superado el problema de seguridad, las iPSC humanas también deben ser aplicables en medicina regenerativa (Takahashi, y otros, 2007).

### ***2.3 Premio Nobel de Medicina 2012***

En el 2012 la fundación Nobel dio su reconocimiento tanto al Dr Shinya Yamanaka y Sir John Gurdon, con el Premio Nobel de Medicina por sus innovadoras contribuciones al campo de la reprogramación celular. John B. Gurdon descubrió en 1962 que la especialización de las células es reversible. En un experimento clásico, reemplazó el núcleo de células inmaduras por un núcleo de una célula intestinal madura en un huevo de una rana. Esta célula de huevo modificada se convirtió en un renacuajo normal. El DNA de la célula madura todavía tenía toda la información necesaria para desarrollar todas las células en la rana. Por otro lado, el Dr. Shinya Yamanaka descubrió más de 40 años más tarde, cómo las células maduras intactas en ratones podrían reprogramarse para convertirse en células madre inmaduras. Sorprendentemente, al introducir solo unos pocos genes, se logró reprogramar las células maduras para que se conviertan en células madre pluripotentes, es decir, células inmaduras que pueden desarrollarse en todo tipo de células en el cuerpo. Hay que tener en cuenta que, en una era de intensa competencia entre científicos, el lugar de Gurdon y Yamanaka en la historia del Nobel es indiscutible. El impacto de sus respectivas contribuciones al campo de la reprogramación es claro y prometedor (Colman, 2013).

### 3.0 Características de células iPSC

Desde del desarrollo de las iPSC en 2006 se abordaron estudios para comprobar su parecido génico y morfológico con las células troncales embrionarias. Al ser unas células con muchas expectativas en la medicina regenerativa se necesitaba la confirmación de que al colocarlas en el paciente no se presentarán graves anomalías como teratomas o rechazo inmunológico. Entre las metodologías usadas para esta comparativa, están:

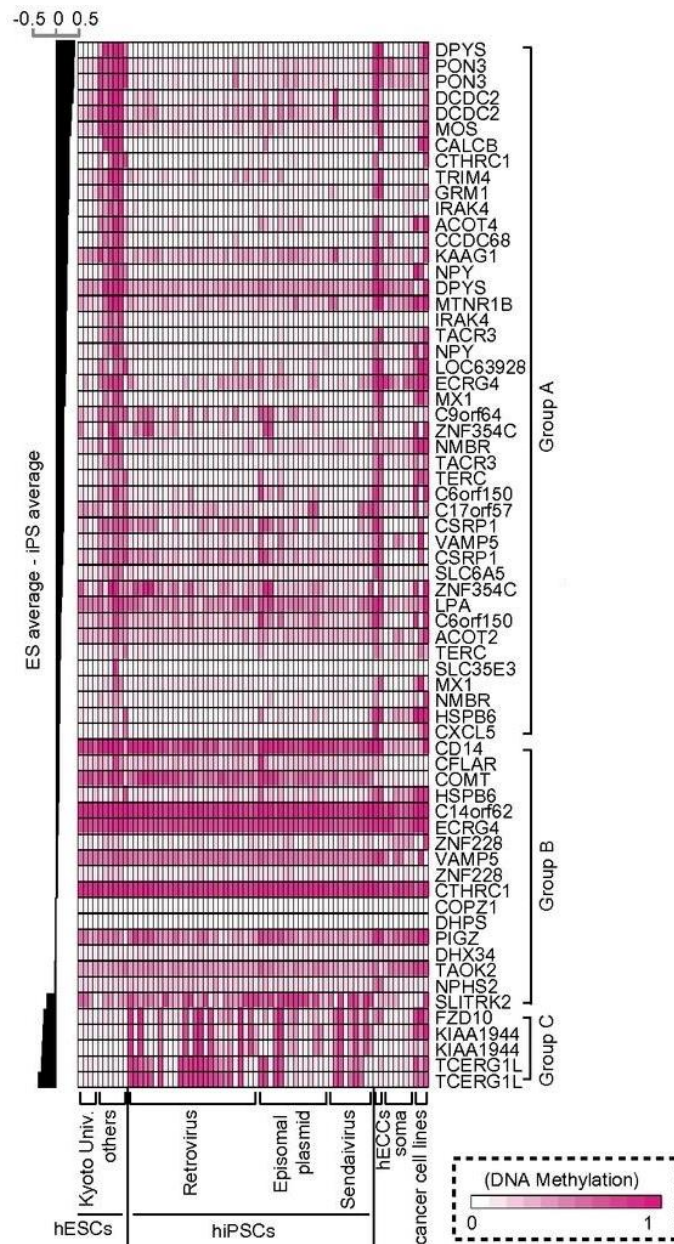
- La formación de teratomas y análisis histológico: para demostrar la capacidad de las iPSC de desarrollar las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo)
- Secuencia genómica por bisulfito la cual permite realizar un mapeo de metilaciones alelo-específicas en las islas CpG.
- Determinación de cariotipos y SSLP (polimorfismo de longitud de secuencias simples) por PCR.
- Análisis por Western Blot.
- RT-PCR (reacción de la polimerasa con transcriptasa inversa) de marcadores moleculares.
- Microrrays de DNA.
- Diferenciación in vitro de las iPSC
- Inmunoprecipitación de la cromatina (Takahashi & Yamanaka, 2006)

Las similitudes encontradas por dichas metodologías, fueron:

- Morfología tridimensional de colonias con bordes regulares.
- Expresión de todo el conjunto de genes de pluripotencialidad.
- Expresión de marcadores superficiales SSEA-4, TRA1-60, TRA2-49, TRA1-81.
- Elevada actividad de la telomerasa.
- Ciclo celular corto (10-12 horas).
- No producir proteínas de linaje específico.
- Promotores de genes de pluripotencialidad libres de metilaciones.
- Histonas con metilación preferencialmente de lisina 4 y/o 9.
- Formar cuerpos embrioides con potencialidad para la generación de las tres capas embrionarias (Takahashi, y otros, 2007).

Existe un número sustancial de informes que han discutido sobre la similitud de estas células, y sus hallazgos siguen siendo controvertidos. Algunos han argumentado que las células difieren en su expresión génica y en los patrones de metilación del DNA y las propensiones a la diferenciación. La mayoría de estos estudios utilizaron un número relativamente pequeño de líneas de iPSC y CTE (2-12 líneas iPSC y 26 líneas CTE). En cambio, un estudio donde se analizaron exhaustivamente la expresión génica, la expresión de micro RNA y la metilación del DNA fue a partir de 49 líneas iPSC humanas y 10 líneas celulares humanas TE que se habían cultivado en las mismas condiciones y no encontraron firmas moleculares que pudieran usarse para distinguir los tipos de células (Koyanagi-Aoi, y otros, 2013) (Figura

15). Además, otros estudios que utilizaron un gran número de líneas celulares no encontraron diferencias claras en las firmas moleculares entre los dos tipos de células. En conjunto, se sugieren que, si bien existen variaciones entre las iPSC y las CTE, las variaciones se superponen y las iPSC y las CTE son difíciles de distinguir (Takashi, 2016).



**Figura 15. Comparación de expresión metilación de DNA en iPSC y CTE.** Los perfiles de metilación del DNA para los CpG contenidos en los DMR (regiones metiladas diferenciadas) de CTE- iPSC. Las sondas se organizan en orden de las diferencias entre el nivel promedio de metilación del DNA de las CTE- iPSC. El mapa de calor representa los niveles de metilación del DNA de muestras completamente metiladas (1, magenta) a no metiladas (0, blancas). Tomada de (Koyanagi-Aoi, y otros, 2013)

### 3.1 Epigenética de las iPSC

El término “epigenética” fue introducido en los años cincuenta por Conrad H. Waddington, quien la concibió como *“el análisis causal del desarrollo”, que implica todas las interacciones de los genes con su medio ambiente*. En la actualidad, el término “epigenética” *se entiende como la regulación génica mediada por modificaciones de la estructura de la cromatina (material genético empaquetado alrededor de proteínas), o como aquellos cambios heredables en la expresión genética que son independientes de la secuencia de nucleótidos, es decir, que ocurren sin cambios en la secuencia del DNA* (Delgado Coello, 2011).

Es importante señalar que el proceso de reprogramación por el cual una célula somática adquiere la pluripotencialidad no es una transformación genética, sino que consiste en una transformación epigenómica (Cortés & García Pérez, 2011). El estado pluripotente de las CTE se aplica mediante factores epigenéticos estrechamente vinculados a la red del factor de transcripción de la pluripotencialidad, que median la compactación de la cromatina por la modificación de histonas y la metilación de secuencias denominadas CpG presentes en sitios de regulación. Restablecer el estado epigenético de las células somáticas al de las CTE es una de las tareas finales para los factores de reprogramación en la generación de iPSC (Liang & Zhang, 2013).

Durante la generación de las iPSC, la cromatina de células somáticas debe reorganizarse a un estado similar a las CTE, con heterocromatina poco organizada y abundantes modificaciones de eucromatina. Parece que los eventos de reorganización de la cromatina tienen lugar de manera coordinada y secuencial. El reordenamiento de la heterocromatina, caracterizado por la presencia de histona H3 lisina 9 trimetilación (H3K9me3) y HP1, precede a la activación de Nanog, mientras que el enriquecimiento de las marcas de eucromatina ocurre simultáneamente con la activación de Nanog. Consistentemente, la heterocromatina se reorganiza y se dispersa cuando las células reprogramadas parcialmente se convierten en iPSC por inhibición dual de MEK y GSK3. Por lo tanto, la reorganización de la cromatina del estado somático a un estado embrionario, parece ser necesaria para la activación de los circuitos de pluripotencialidad (Liang & Zhang, 2013).

Sin embargo, tal reorganización drástica de la cromatina parece tener una latencia sustancial en el proceso de reprogramación, no se puede afirmar que las iPSC sean totalmente idénticas a las CTE ya que las células somáticas de origen, poseen una memoria epigenética. Se han hecho estudios donde las iPSC son más susceptibles a diferenciarse en la célula somática predecesora (Espinasa Jaramillo, Cruz Loya, & Gonzalez Ichida, 2011).

En un estudio de comparación epigenética de iPSC originarias de células sanguíneas, obtenidas por medio de retrovirus, virus Sendai y vectores episomales. Se obtuvo que más del 99% de los sitios CpG en todas las líneas de iPSC no mostraron diferencias en los niveles de metilación, en comparación a CTE; por lo tanto, las iPSC eran casi idénticas a las CTE en epigenética, independientemente de los tipos de vectores utilizados para la generación de iPSC. Aunque una comparación más exhaustiva reveló que las iPSC generadas a través de virus Sendai presentaban menos sitios de metilación aberrante (Nishino, y otros, 2010).

### 3.2 Inmunogenicidad de las iPSC

El trasplante alogénico es el tipo de trasplante más común para tratar las leucemias, pero a la vez es el más tóxico y que supone un mayor riesgo para el paciente. En este tipo de trasplante se le infunde al paciente, células procedentes de la médula ósea, de un donante que es idéntico o casi idéntico en un conjunto de proteínas (conocidas como HLA). Por lo tanto, cuanto más compatible sean los tejidos más probabilidades hay que las células trasplantadas comiencen a producir nuevas células sanguíneas. Una de las principales desventajas de estos trasplantes es el rechazo inmune alogénico, el cual está mediado principalmente por la respuesta inmune dependiente de las células T (Fu, 2014).

Las CTEh han sido una gran opción en los trasplantes alogénicos, pero al ser de donantes genéticamente similares sigue habiendo riesgo de rechazo, esto esperaba ser subsanado cuando se desarrollaron las iPSC. En aplicación a la medicina regenerativa, las células utilizadas serían células reprogramadas del mismo paciente a tratar, esperando así evitar el rechazo alogénico.

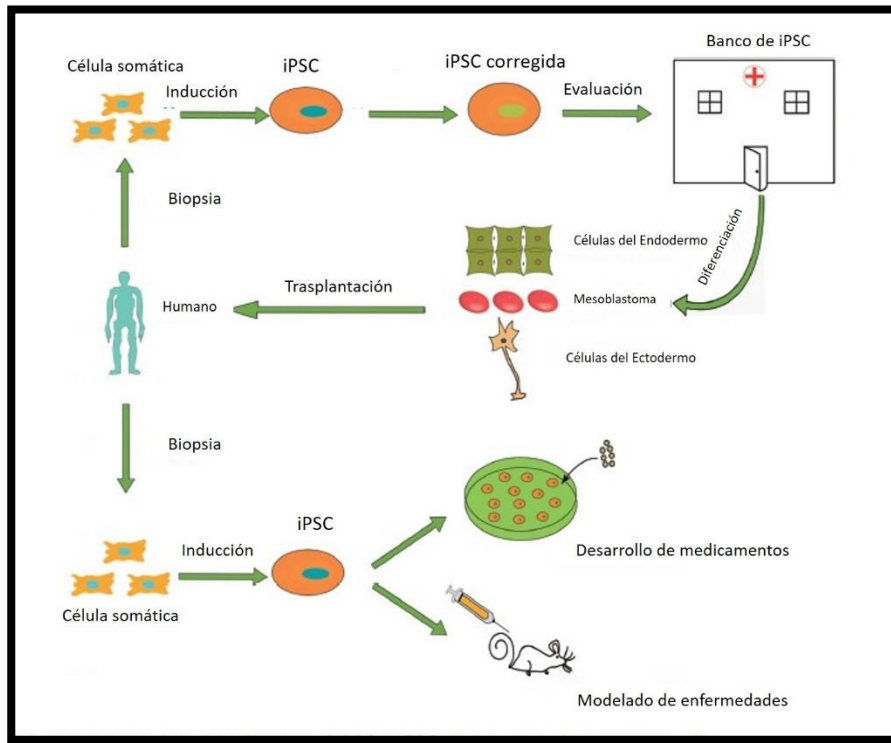
En contraste a esta suposición, un estudio realizado en el 2011, demostró que células derivadas de iPSC de ratones B57BL/6 por medio de vectores episomales pueden presentar inmunogenicidad tras la implantación en ratones B6 singénicos (Fu, 2014), dicho estudio fue realizado con solo una línea de CTE singénicas. Como contraposición a esto, en 2013 otro estudio similar realizó una comparación entre los teratomas formados a partir de 5 líneas de CTE y 7 líneas de iPSC, hallando que no existían diferencias pronunciadas de inmunogenicidad entre ambos tipos de células. En otro estudio separado del 2013, se exploró la inmunogenicidad de las células endoteliales, los hepatocitos y las células neuronales derivadas de CTE y iPSC in vitro, utilizando injertos originados de ratones quiméricos. Estos estudios de cocultivo y trasplante afirmaron conjuntamente que las iPSC singénicas indiferenciadas y su progenie, no mostraron inmunogenicidad, ni in vitro ni in vivo (Zhengping , Yanmei , & Xuetao, 2014). De igual manera el trasplante autólogo de células neurales derivadas de iPSC en el cerebro de monos, condujo a una respuesta inmune mínima (Morizane, y otros, 2013). Para resolver esta aparente discrepancia, un estudio mostró que la falta de inmunogenicidad de las iPSC derivadas de B6 fue a causa de que fueron trasplantadas bajo la cápsula renal donde hay ausencia de células funcionales presentadoras de antígenos en el riñón (Todovora, Kim, Hamzeinejad, He, & Xu, 2016). Por lo tanto, se requiere la presencia de células funcionales presentadoras de antígeno en el sitio de trasplante para revelar la inmunogenicidad de las células derivadas de iPSC.

La inmunogenicidad de las iPSC puede ser causada por tres razones:

- 1.- En comparación con las CTE, las iPSC son epigenéticamente anormales, la expresión anormal de las proteínas inmunogénicas expresadas durante la diferenciación de las iPSC no se presenta en las CTE.
- 2.-Se han detectado mutaciones codificantes somáticas en las líneas de iPSC, las cuales pueden crear nuevos determinantes inmunogénicos como los antígenos tumorales desarrollados en células cancerosas.
- 3.-La translocación genómica derivada de metodologías por vectores virales, podría crear proteínas de fusión y nuevos determinantes inmunogénicos.

Por lo tanto, además de la inmunogenicidad de las células derivadas de iPSC, un problema de seguridad más serio en su aplicación a la terapia celular, ya que su inestabilidad genómica que puede aumentar considerablemente el riesgo de cáncer. Esta preocupación por el cáncer plantea un grave cuello de botella para el desarrollo de la medicina regenerativa individualizada utilizando iPSC de los pacientes. En su

lugar, el esfuerzo futuro se dedicará a establecer un banco de células iPSC (Figura 16) genéticamente estables y seguras para la aplicación clínica (Xin, Wenjuan, Xuemel, & Yang, 2017).



**Figura 16. Potencial aplicación de iPSC.** Modificada de (Zhengping, Yanmei, & Xuetao, 2014)

Si bien el régimen de supresores inmunitarios puede suprimir eficazmente las respuestas inmunitarias alogénicas, el uso persistente de supresores inmunitarios aumentará significativamente el riesgo de infección y cáncer. El rechazo inmune alogénico está mediado principalmente por las respuestas inmunes dependientes de las células T. Se ha demostrado que los regímenes estándar de medicamentos inmunosupresores pueden reducir significativamente la respuesta inmune para prolongar la supervivencia de los xenoinjertos derivados de iPSC, pero eventualmente no pueden prevenir el rechazo inmune. Una opción a esto, según las vías críticas para la activación de las células T, es posible inducir la tolerancia inmune de las células alogénicas derivadas de iPSC al interrumpir las vías coestimuladoras de las células T, como las vías CD28 CD80 / CD86 y CD40-CD40L (Xin, Wenjuan, Xuemel, & Yang, 2017).

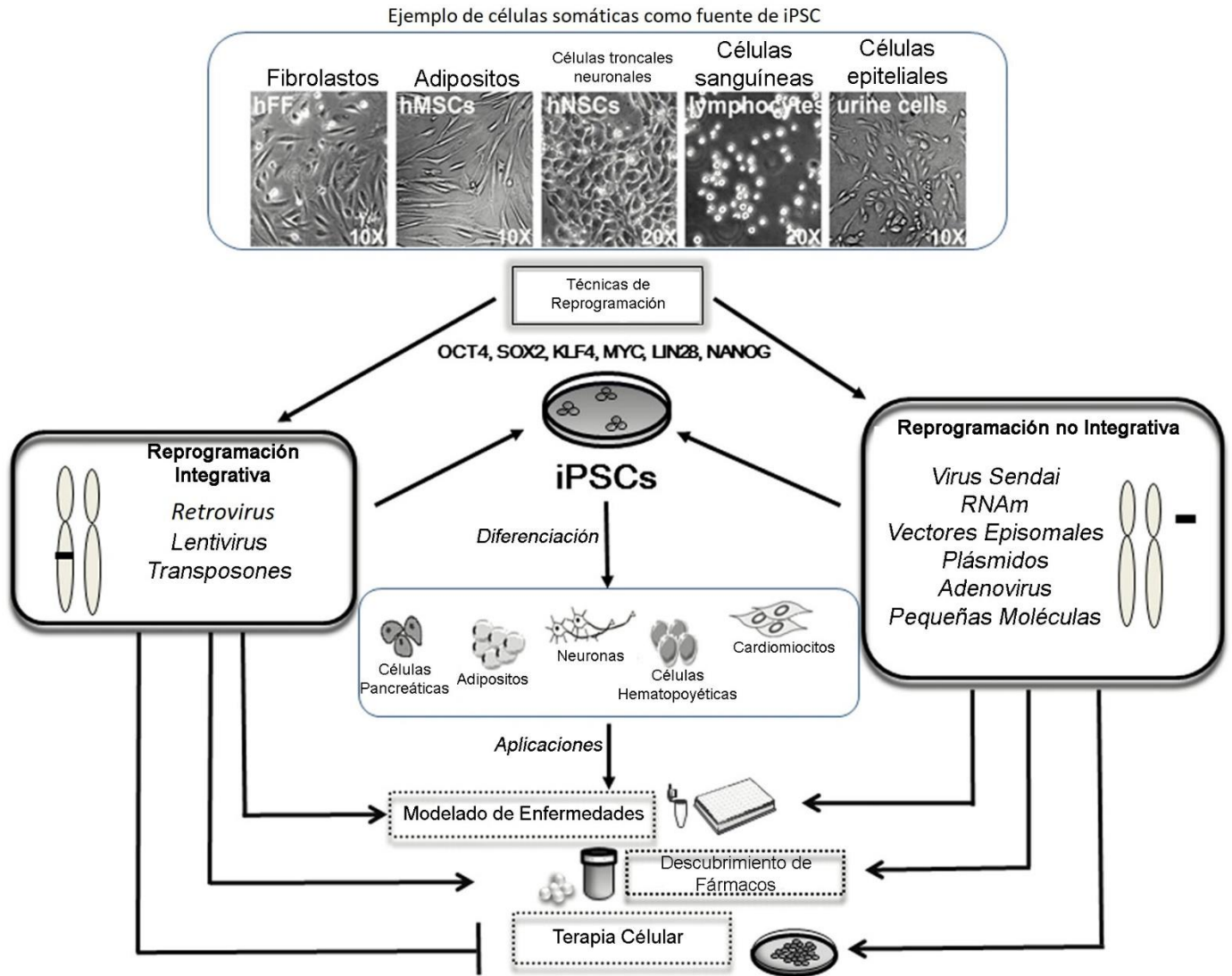
A pesar de su potencial para curar enfermedades graves y los datos alentadores de ensayos clínicos, uno de los desafíos clave para la terapia basada en CTPH es el rechazo inmune por parte del receptor. Con datos extensos de la inmunología del trasplante en ratones y los datos acumulados sobre las respuestas inmunes humanas a los aloinjertos, se ha vuelto aparentemente factible desarrollar estrategias seguras y efectivas para inducir la tolerancia inmune específica del injerto en un futuro próximo. Tal logro facilitará enormemente el desarrollo clínico de la terapia basada en iPSC.

## 4.0 Metodologías de Obtención de iPSC

A partir del desarrollo de las iPSC en 2006, la metodología de creación de células troncales pluripotenciales, fue reproducida por diversos investigadores a nivel mundial, algunos siguieron la metodología convencional e incluso otros encontraron la manera de introducir los factores de reprogramación sin la necesidad de acudir a la transducción retroviral (Yu J. , y otros, 2009). Independientemente de la metodología usada para obtener iPSC, los factores de reprogramación han sufrido pequeños cambios, aun en la actualidad varios investigadores siguen usando los factores propuestos por el Dr Shinya Yamanaka y su equipo. A continuación, se da una breve descripción de los factores de reprogramación de mayor relevancia en la autorrenovación y en la pluripotencialidad.

- Oct4 (POU5F1). Pertenece a la familia POU de factores de transcripción específicamente expresados en ESC, en el embrión temprano y en células germinales. Fue originalmente designado como Oct3 o como Oct4. Su ausencia en embriones causa la muerte en útero en estadios de preimplantación. La función de Oct4 es importante para los primeros eventos de diferenciación del embrión en estadios entre mórula y blastocisto. Los niveles de expresión de Oct4 en el embrión temprano dictan si las células pertenecen a la ICM (nivel alto) o al trofoectodermo (nivel bajo). El papel de Oct4 (junto con Sox2 y Nanog) en las células de la masa interna y de las células del epiblasto (también denominado ectodermo primitivo) es preservar la pluripotencialidad.
- Sox2. Es miembro de la familia Sox (*SRY-related HMG-box*), parte de una familia de factores de transcripción expresados en CTE, en células germinales y algunas CT adultas, específicamente del sistema nervioso. La ausencia de Sox2 en embriones causa la muerte debido al desarrollo fallido del epiblasto. Tal como Oct4, Sox2 es indispensable para mantener la pluripotencialidad de CTE, pero con la distinción de Sox2 además tiene funciones en células que no son pluripotenciales.
- Nanog. Se expresa específicamente en ESC manteniendo su autorrenovación y pluripotencialidad. La inhibición de la expresión de Nanog en cultivos de CTE resulta inmediatamente en su diferenciación. Los blastocistos deficientes en Nanog muestran morfología normal, pero la ICM solo produce células parecidas al endodermo parietal.
- Lin-28. Fue descrito como un factor que controla el calendario del desarrollo en el nematodo *C. elegans*, debido a que mutaciones en este gen llevan al desarrollo precoz, aunque el mecanismo molecular de este fenómeno no ha sido bien entendido. Se ha sugerido que puede estar actuando como un factor postranscripcional debido a sus dominios de unión a RNA (CSD, *Cold shock domain*). Se ha observado que Lin-28 puede ser prescindible para la reprogramación celular, pero es de considerable importancia para la autorenovación y para evitar la diferenciación (22, 23).
- c-Myc. Es un conocido oncogén y un regulador de ciclo celular en varios tipos de células tanto normales como tumorales. Actúa en la inhibición de la expresión de genes supresores de tumores que controlan el paso de la fase G1 a la fase S en el ciclo celular.
- Klf4. También conocido como *gut-enriched Krüppel-like factor*, pertenece a una familia conservada de factores de transcripción con dedos de zinc, importante en la regulación de múltiples procesos biológicos tales como la diferenciación, la proliferación y la apoptosis (24).

En la actualidad las metodologías de reprogramación se dividen en dos grupos, reprogramación integrativa y no integrativa (Figura 17).



**Figura 17. Diagrama de algunos métodos de reprogramación de iPSC a partir de células somáticas y sus posibles aplicaciones.** Modificada de (Revilla, y otros, 2015)

La reprogramación integrativa que es aquella donde por medio de vectores retrovirales se introducen factores de reprogramación en una célula huésped (Takahashi & Yamanaka, 2006). Metodologías posteriores propusieron el uso de lentivirus para contrarrestar la resistencia de algunas células, como las neuronas, a la reprogramación por retrovirus (J., y otros, 2007). Otra metodología integrativa son los transposones, los cuales son elementos móviles de DNA que se mueven alrededor del genoma y son una herramienta prometedora para la generación iPSC, ya que su integración en el genoma garantizaría la expresión a largo plazo. Algunas limitaciones de estas tecnologías están relacionadas con el silenciamiento

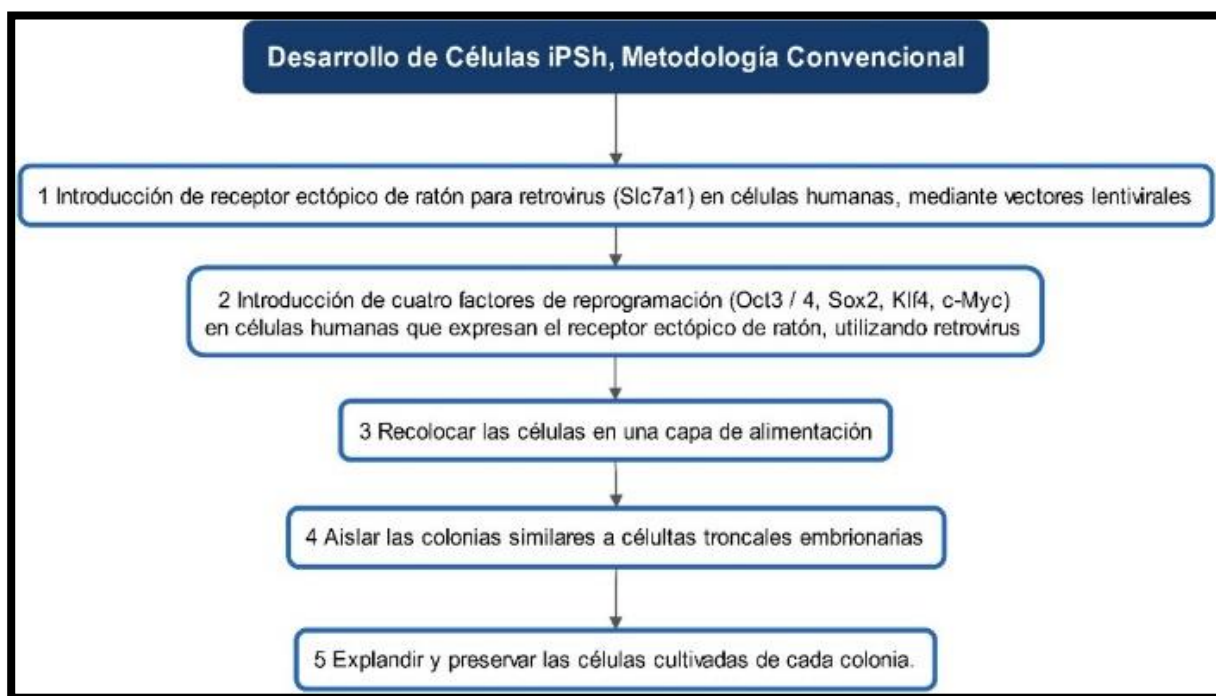


incompleto y los sitios de integración del genoma múltiple que podrían resultar en el desarrollo de tumores malignos, especialmente en ensayos clínicos (U. & Benvenisty, 2011).

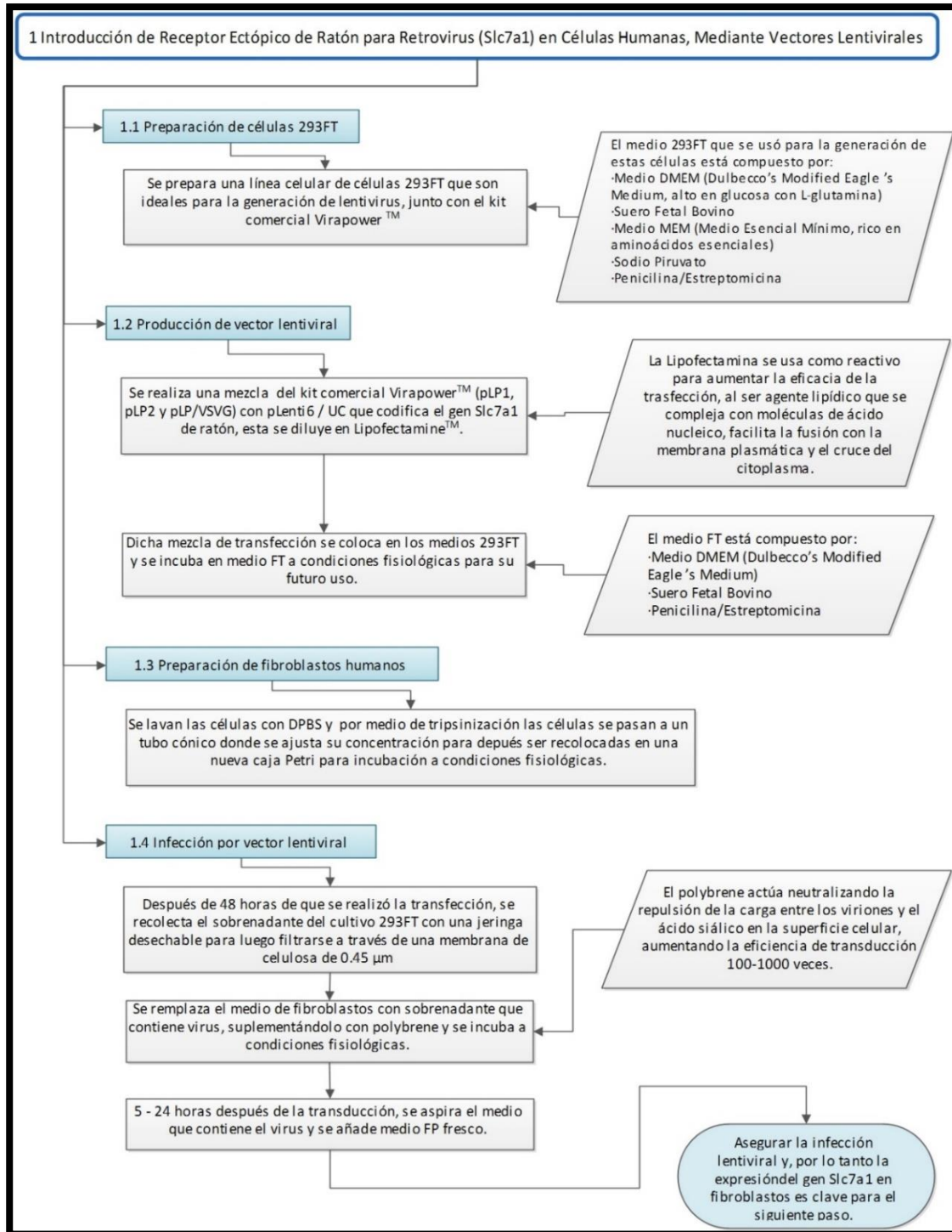
Tomando en cuenta los problemas clínicos que podrían presentarse al haber una integración en el genoma huésped. Se desarrollaron metodologías de reprogramación no integrativas, las cuales son las más fiables para la aplicación de iPSC en la medicina regenerativa. Entre las más usadas se encuentra la reprogramación por medio de vectores virales Sendai, por medio de RNAm y vectores episomales.

#### ***4.1 Metodología convencional por vectores retrovirales.***

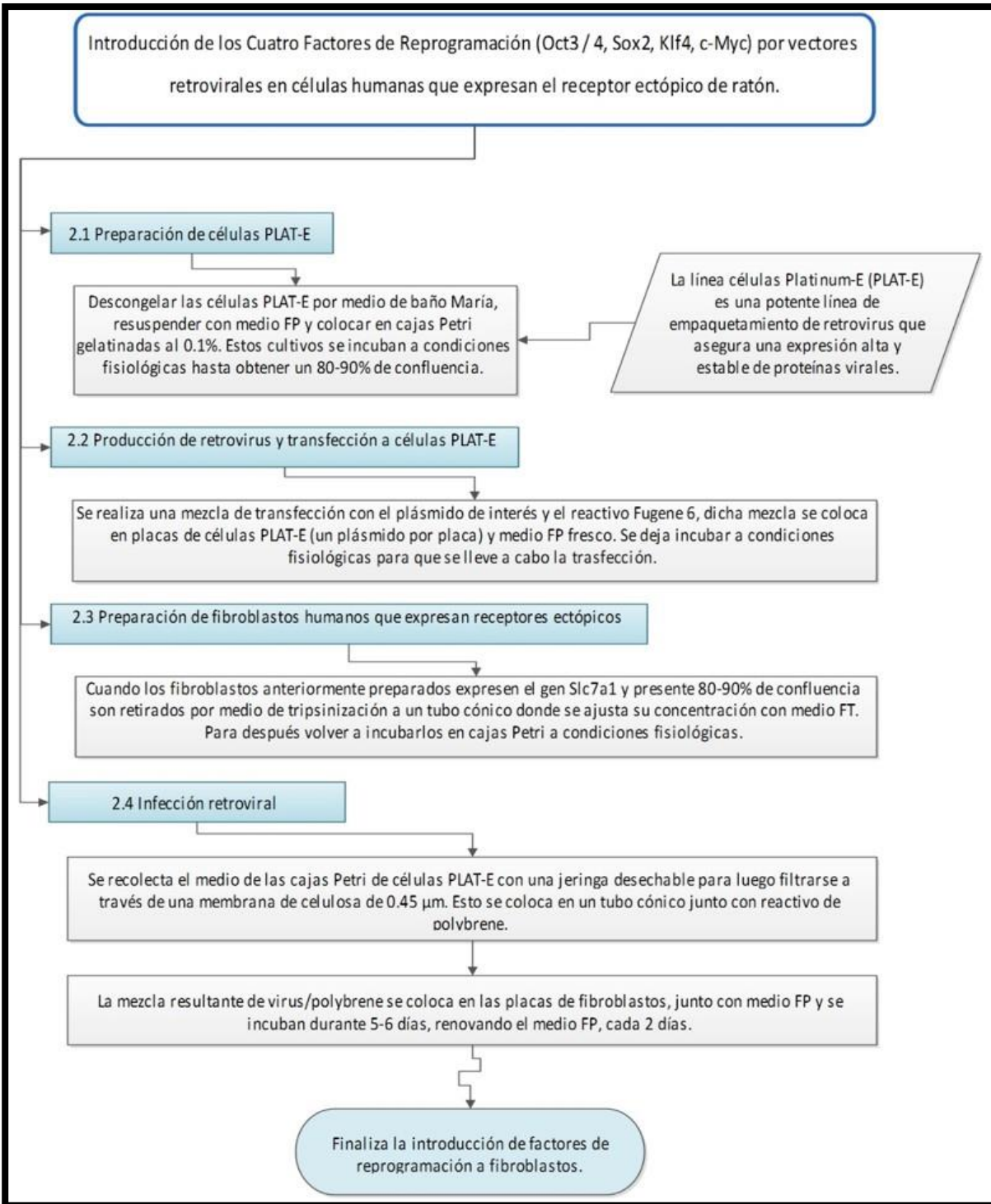
El método de reprogramación de células somáticas mediante transducción retroviral fue la primera metodología empleada para la generación de iPSC. Involucra la introducción de 4 factores de reprogramación OSKM (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc) en la célula huésped por medio de retrovirus y ayuda de lentivirus. A pesar de su alta eficiencia la integración en el genoma del huésped conlleva un riesgo en la inestabilidad genómica inducida. Aun así, esta metodología es la base de las técnicas posteriores de reprogramación, por eso su importancia de revisarla a detalle (Figura 18-23). Para complementar la información del capítulo 2- Desarrollo de las células troncales inducidas, se presenta un esquema basado en el capítulo 10 “Human Induced Pluripotent Stem Cell Generation: Conventional Method” del libro “Human Stem Cell Manual A Laboratory Guide” donde se indica paso a paso, tal cual una receta, el procedimiento a realizar para obtener iPSC por medio de la convencional a base de transducción por retrovirus (Asaka & Shinya, 2012).



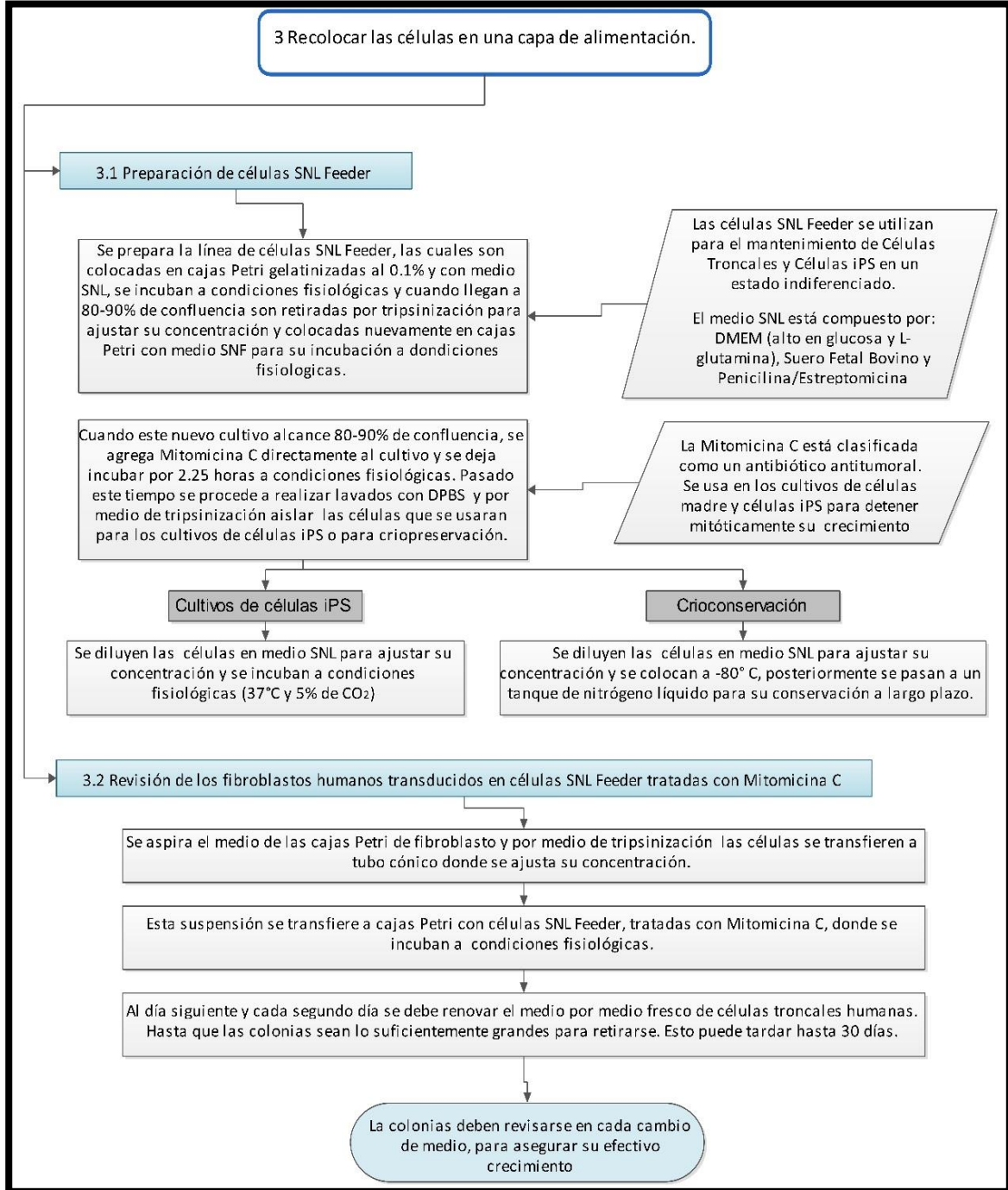
**Figura 18. Esquema general del desarrollo de iPSC por medio de la metodología convencional.**



**Figura 19. Esquema del primer módulo de creación de iPSC. El acondicionamiento de las células donadoras por medio de lentivirus.** A pesar de que este módulo no es definitivo para la producción de iPSC, es esencial para obtener una mayor eficiencia al momento de la transducción retroviral. Por medio de Lentivirus se introduce el receptor de ratón para retrovirus Sic7a1, en las células huésped. Esto promueve un aumento en la eficiencia de transducción al 60%, siendo que, sin la introducción del receptor, la eficiencia sería de 20%.



**Figura 20. Esquema del segundo módulo de creación de iPSC. La introducción de factores para la reprogramación de células maduras a células troncales.** Este módulo es esencial, los factores de reprogramación son introducidos por medio de retrovirus en las células huésped previamente preparadas con receptores de retrovirus para poder asegurar una alta eficiencia de la transducción.



**Figura 21. Esquema del tercer módulo de creación de iPS. El acondicionamiento de cajas Petri con células de alimentación para las futuras colonias de iPS. Una vez llevada a cabo la introducción de los factores de reprogramación en las células huésped, estas se colocan en diferentes medios nutritivos para su preservación, de igual manera se le agrega Mitomicina C a los cultivos para evitar una diferenciación específica de las iPS obtenidas. Teniendo ya colonias de iPS estables éstas pueden ser preservadas para diferenciación en células específicas o criopreservación.**

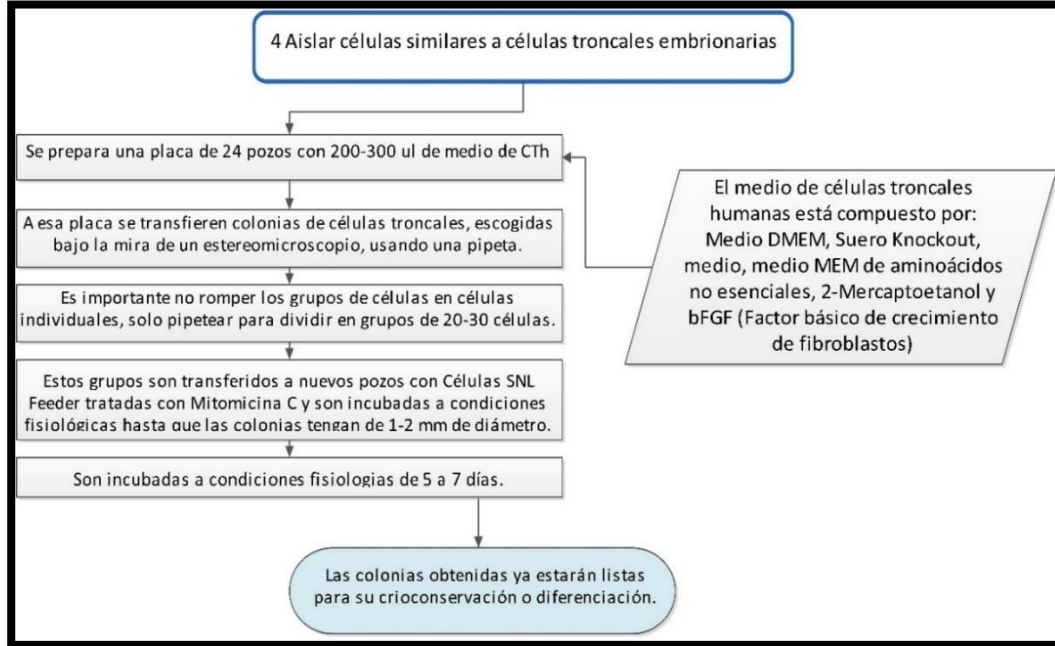


Figura 22. Esquema del cuarto módulo de creación de iPSC. El aislamiento de células ya reprogramadas, con similitudes a células troncales embrionarias.

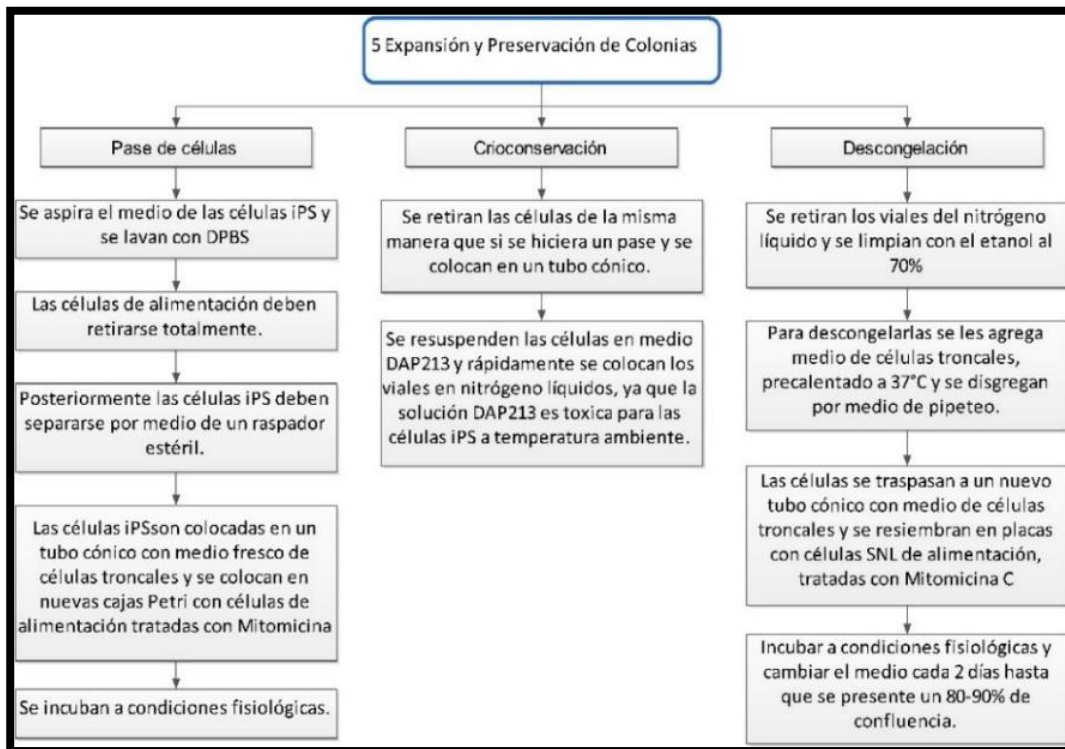
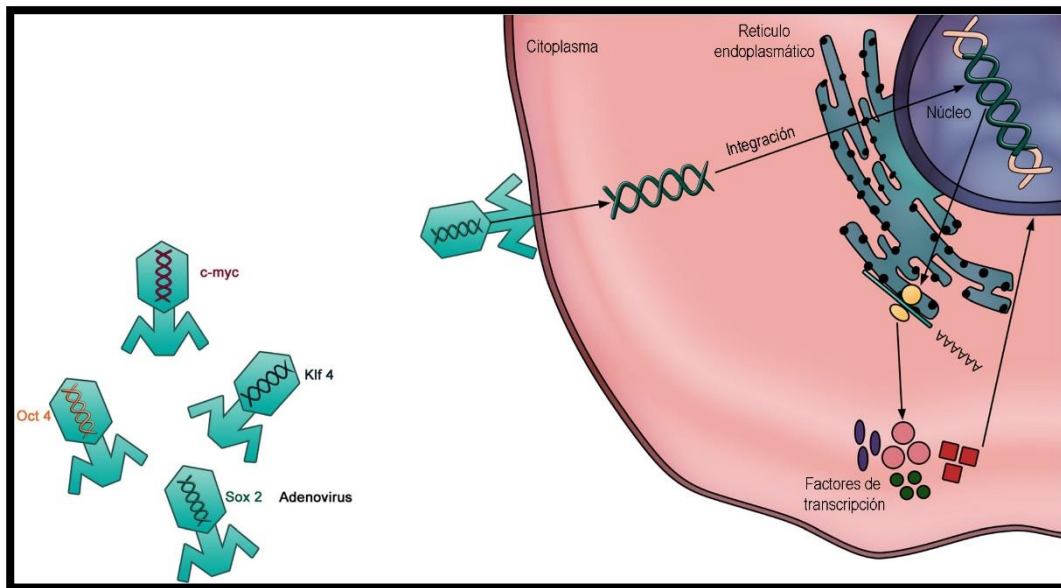


Figura 23. Esquema del cuarto módulo de creación de iPSC. La preservación de cepas de iPSC obtenidas.

Esta metodología de reprogramación por medio de retrovirus ha quedado algo obsoleta en el ámbito de la medicina regenerativa, debido a la posible integración del genoma retroviral en el genoma huésped. Pero es la base a todas las metodologías siguientes que han logrado la integración por medio de técnicas no integrativas y omitiendo factores de reprogramación a posibilidad a desarrollar teratomas como c-Myc. Aun así, sigue siendo usada para generar iPSC con propósitos de desarrollo de fármacos y modelado de enfermedades ya que, pese a la posible integración del genoma, los reactivos y productos necesarios para su elaboración son totalmente comerciales, accesibles o fácil de remplazar con algún reactivo similar, a comparación de las demás metodologías (Figura 24).



**Figura 24. El método de reprogramación integradora mediante transducción viral.** Modificada de (Abou Saleh, y otros, 2018)

#### 4.2 Reprogramación por vectores virales Sendai

Unas de las limitaciones clínicas de las iPSC que se generan por la introducción de factores de reprogramación por medio de retrovirus, es la probabilidad de generar tumorigenicidad. Entre las posibles soluciones a esto se presentó el uso de adenovirus y plásmidos, pero el riesgo de integración de genes extraños al genoma del paciente aún permanecía. En el 2009 un grupo de investigadores japoneses desarrollaron un vector de virus Sendai que permite la expresión de transgenes sin riesgo de modificación del genoma del huésped dando como resultado iPSC libres de virus, genéticamente intactas y que llevan el mismo DNA de las células originales (Fusaki N. , Ban, Nishiyama, Saeki, & Hasegawa, 2009).

Estudios posteriores confirman que el método de SeV (sendai-viral) es eficiente y altamente confiable, con una baja carga de trabajo y una completa ausencia de secuencias virales en las líneas celulares producidas. Su mayor limitación es que el kit de elaboración es altamente difícil de conseguir ya que se depende un proveedor y aun no se tiene comercialmente para el área clínica (M Schlegler, y otros, 2015).

### 4.3 Reprogramación por medio de vectores episomales

Otro método para la generación de iPSC consiste en la integración de factores de reprogramación por medio de vectores de DNA episomal. Los episomas son vectores no integrativos y no virales por lo tanto son seguros de usar y el gasto económico es menor ya que se requiere un número menor de transfecciones y presentan una baja posibilidad aleatoria de que haya una integración en el genoma de las células huésped (Drozd, y otros, 2015).

El primer vector episomal usado en este tipo de reprogramación fue oriP / EBNA1 (antígeno nuclear de Epstein-Barr), el cual se usó en 2009 para la reprogramación de fibroblastos dérmicos a iPSC por medio de los factores OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-Myc y KLF4. Esta replicación extracomosomal en células de mamíferos solo requiere un elemento oriP que actúa en cis y un gen EBNA1 que actúa en trans, dicho vector solo se replica una vez por ciclo celular, y debido a la pérdida gradual de vectores episomales celulares en ausencia de fármaco, las iPSC humanas libres de transgén y vector pueden aislarse a través de la subclonación sin más manipulación genética (Yu J. , y otros, 2009). La reprogramación por episomas es una de las metodologías más factibles para creación de iPSC, incluso se han obtenido una eficiencia 10 veces mayor a comparación de la metodología convencional, especialmente en células epiteliales de orina (Drozd, y otros, 2015) (Cuadro 3).

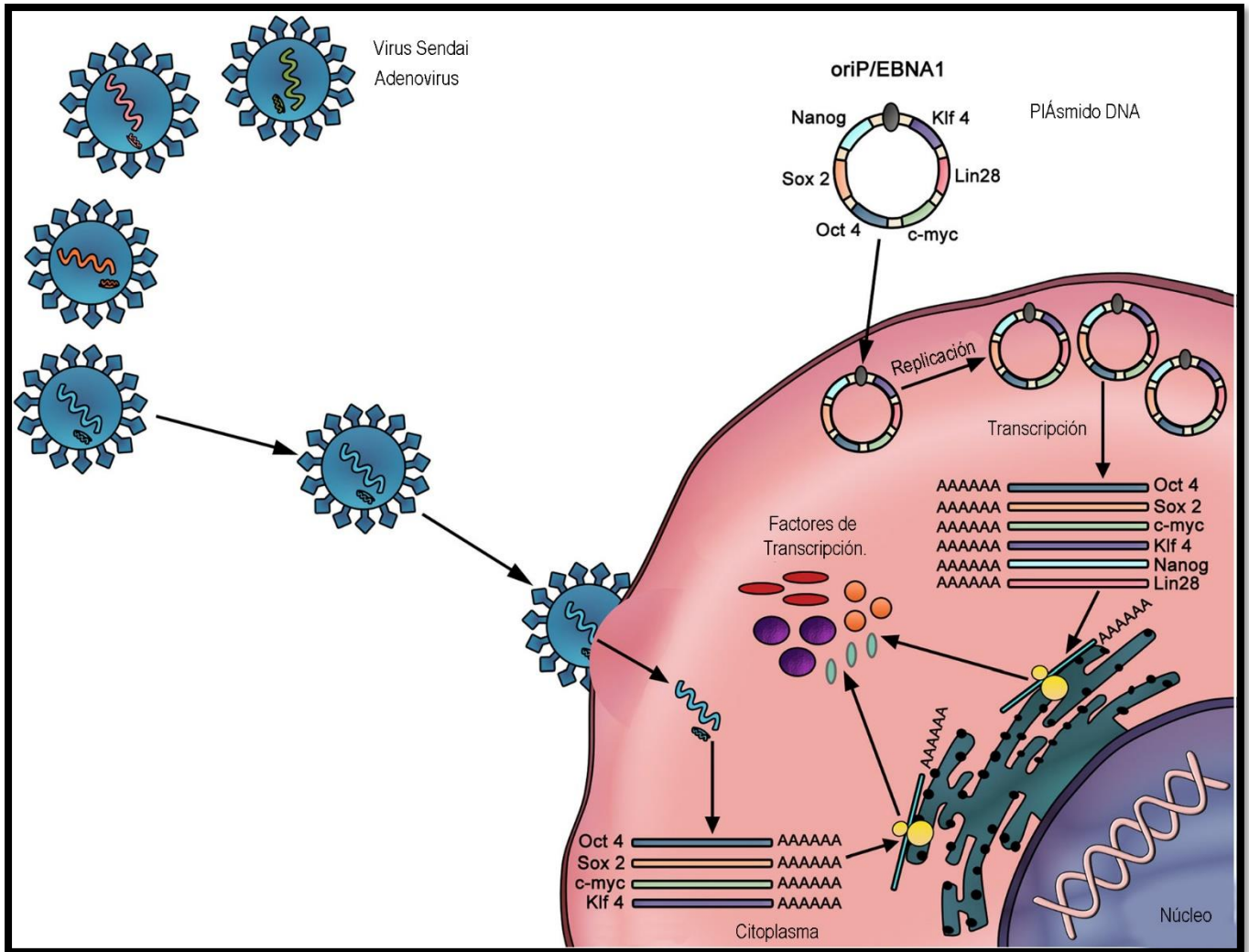
*Cuadro 3. Eficiencia de reprogramación por vectores episomales en diversos tipos de células.*

Origen de células	Morfología	Eficiencia de reprogramación
Tejido de prepucio neonatal	Fibroblástica	0.011%
Tejido de cicatriz adulta	Fibroblástica	0.003%
Fluido amniótico	Epitelial	0.089%
Orina	Epitelial	1.421%

Modificado de (Drozd, y otros, 2015)

### 4.4 Reprogramación por medio de mRNA

La reprogramación de iPSC por medio de RNA mensajero se basa en la síntesis de un mRNA modificado por medio de transcripción in vitro y un inhibidor de interferón soluble para superar respuestas antivirales innatas. Al ser basada en RNA, elimina completamente el riesgo de integración genómica y mutagénesis. Dicho mRNA sintético expresa los factores OSKM (OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC) necesarios para la reprogramación y junto con un vehículo catiónico se facilita la captación por endocitosis, se realiza la transfección repetitiva para mantener la expresión de la proteína ectópica durante días o semanas, según el tiempo requerido para la reprogramación celular (Warren L. , y otros, 2010). El carácter transitorio y no mutagénico de la expresión de proteínas basada en RNA también podría ofrecer importantes beneficios clínicos fuera del dominio de la reprogramación de linajes. Se puede prever fácilmente emplear RNA modificado para expresar transitoriamente proteínas de superficie, como los receptores de referencia para dirigir terapias celulares hacia órganos específicos, tejidos o células enfermas.



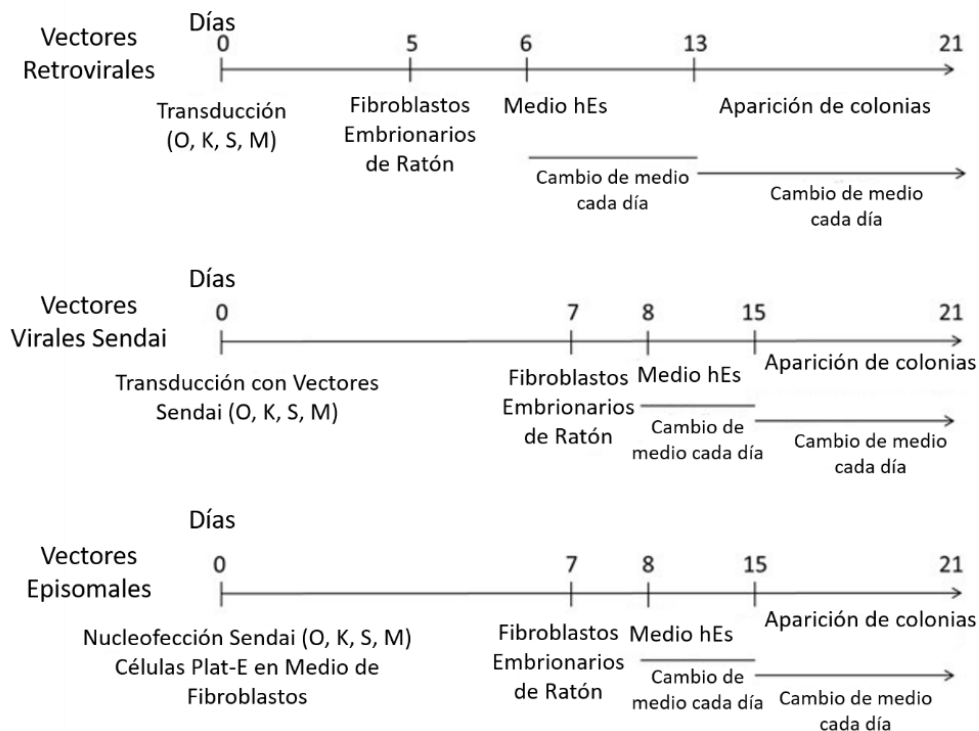
**Figura 25. Métodos no integrativos de reprogramación de iPSC por medio de plásmidos, sendai-virus o la administración de RNA.** Se han desarrollado métodos no integradores (basados en DNA o RNA) para superar el mayor riesgo de inestabilidad genómica y modificaciones de la expresión génica encontradas con los métodos integrativos. Cuando se basa en RNA, el RNAm se administra sin transcriptasa inversa y se traduce directamente en proteínas. El RNA puede ser entregado directamente o utilizando virus. El DNA también puede suministrarse directamente a las células diana en una forma de plásmido autorreplicante que no se integrará al genoma de la célula huésped. El plásmido se transcribe luego a RNAm para su traducción a proteínas. O Oct3 / 4, S Sox2, K Klf4, M c-Myc. Modificada de (Abou Saleh, y otros, 2018)



#### 4.5 Comparación entre metodologías de reprogramación de iPSC

Desde el desarrollo de las iPSC en el 2006, las publicaciones científicas sobre el tema han ido en aumento tanto con aportaciones de nuevas combinaciones de factores de reprogramación menos propensos a generar oncogénesis, nuevos vectores que eviten la integración en genoma de la célula huésped, comparaciones entre diferentes células huésped y su grado de eficiencia. Todavía es un campo muy amplio y maleable en todas las ramas de sus aplicaciones, en la actualidad las metodologías más fiables para el uso en terapia celular han sido las estrategias no integrativas ya que se requiere que el genoma del paciente se mantenga lo más íntegro posible.

A continuación, se darán datos comparativos de las diversas tecnologías de reprogramación ya que entre ellas existen diferencias en cuando a la eficiencia, fiabilidad, carga de trabajo y tasas de anomalías genéticas.



**Figura 26. Representación esquemática de los tres protocolos de reprogramación más adoptados para generar iPSC a partir de fibroblastos embrionarios de ratón. Modificada de (Trevisan, y otros, 2017)**

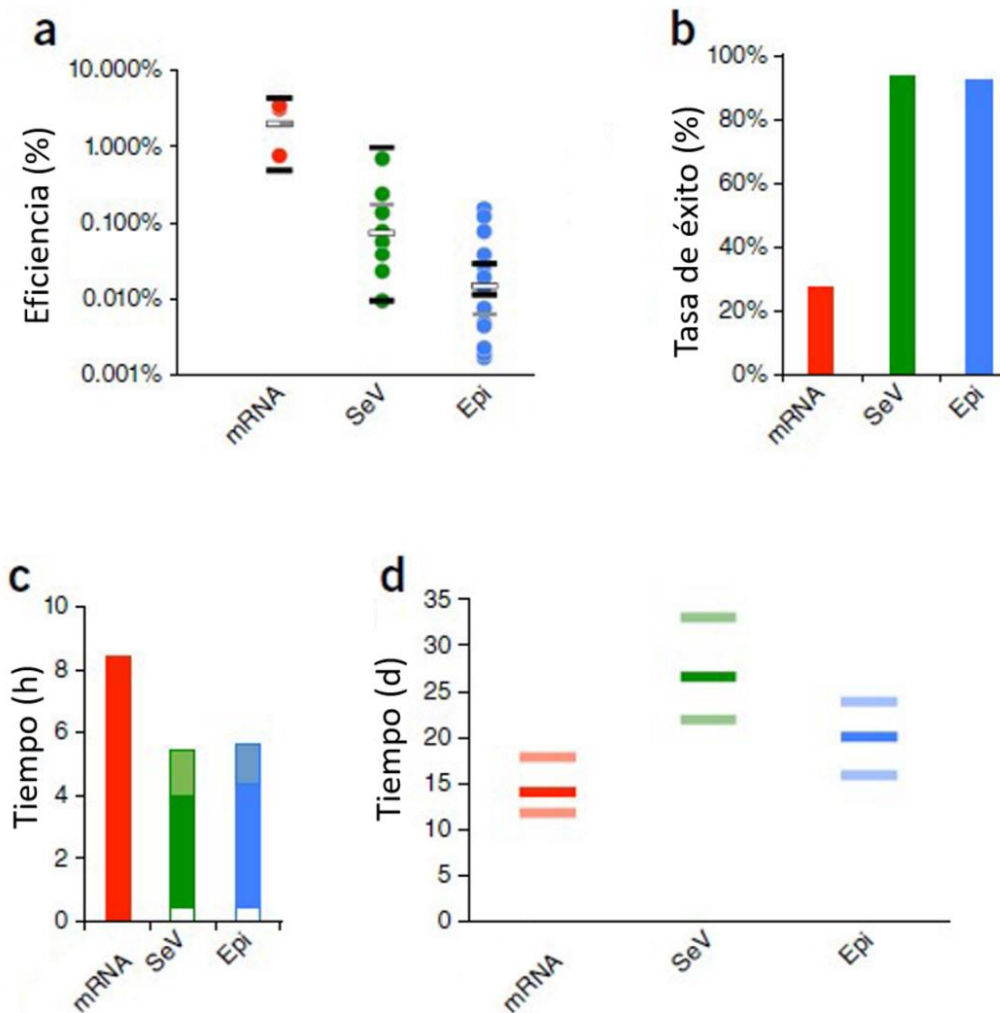


Figura 27. Comparación de rendimiento de métodos de reprogramación no integrativos. (a) Las eficiencias de reprogramación se calcularon como el número de colonias iPSC emergentes por número de células iniciales. Cada punto representa la eficiencia promedio de una muestra. Las barras blancas indican las eficiencias medias de los experimentos exitosos; las barras negras muestran el rango de eficiencias reportadas en publicaciones independientes. (b) Las tasas de éxito de reprogramación para experimentos de utilizando protocolos estándar. Solo los experimentos que produjeron al menos tres colonias se contaron como éxitos. (c) Se evaluó la carga de trabajo práctica total típica (en horas), hasta que las colonias hayan emergido y crecido a un tamaño lo suficientemente grande para la recolección. El tiempo requerido para realizar la expansión de células somáticas adicionales necesaria se muestra como un cuadro blanco. Las casillas sombreadas indican las cargas de trabajo del aislamiento (d) Tiempos de reprogramación de (en días), desde la primera transfección y / o la transducción hasta que las colonias están listas para ser recogidas. Las barras muestran el rango observado (banda de luz) y promedio (banda oscura) para cada método. Tomada de (Schlaeger, y otros, 2015)

**Cuadro 4. Diferentes metodologías de obtención de Células Troncales Pluripotenciales Inducidas**

Método	Tipo de célula	Factores de Reprogramación	I/NI	Ventajas	Desventajas	Seguridad Clínica	Generación de iPSC (%)	Referencias
<b>Retrovirus</b>	FDha	OSKM	I	Alta eficiencia	Riesgo de oncogénesis	Muy baja	~0.1	(Takahashi, y otros, 2007)
<b>Lentivirus</b>	FPNh FEh	OSN-L28	I	Alta eficiencia	Desarrollo tardado	Baja		(Yu, y otros, 2007)
<b>Adenovirus</b>	FEr CHF	OSKM	NI	Bajo riesgo de integración	Desarrollo tardado Baja eficiencia Solo células permisivas	Baja	~0.0002	(Stadtfeld, y otros, 2008)
	FEh	MKOS					~0.0002	(Zhou & Freed, 2009)
<b>Virus Sendai</b>	FDha FPNh	OSM	NI	No patógeno para el humano	Desarrollo tardado	Media	~0.1	(Fusaki N. , Ban, Nishiyama, Saeki, & Hasegawa, 2009)
	Células T	OSKM		Alta eficiencia			~0.1	(Seki, Yuasa , & Fukuda, 2010)
	FDha CD34+_SCU FEh	OSKM		Vector extraíble			~0.03-0.9	(Ban, y otros, 2011)
	FEh	OKSM		Bajo riesgo de integración			~0.01-0.04	(Macarthur, y otros, 2012)
<b>Plásmidos</b>	FEr	OSKM	NI	Bajo riesgo de integración	Factores de expresión transitoria	Media	~0.002	(Okita , Nakagawa, Hyenjong, Ichisaka, & Yamanaka , 2008)
	FEr Adiposito FEh FPNn	LMKOS	I	Vector extraíble			~0.01	(Kaji, y otros, 2009)
	FEr	OSKM	NI	Desarrollo sencillo			~0.001	(Gonzalez, y otros, 2009)
	FFh	ONS-L28					~0.0002	(Si Tayeb, y otros, 2010)
	FFh	OSKM					~0.003	(Monserrat, y otros, 2011)
<b>Episomas</b>	FFh	OSN, L28, MK, SV40	NI	Bajo riesgo de integración Vector extraíble	Eficiencia muy baja	Media	~0.0003-0.0006	(Yu J. , y otros, 2009)
	CD34+_SP	OSKML28, SV40, TP53		Bajo riesgo de integración			~0.05	(Chou, y otros, 2011)
	FDh CPD	OSNLL28, SV		Desarrollo Sencillo			~0.001-0.003	(Okita, y otros, 2011)
	CD34+_SP	OSKMN, L28, SV40					~0.003	(Mack, Kroboth, Rajesh, & Wang, 2011)
	CMSP	OSKM, L28, TP53					~0.0005-0.04	(Okita, y otros, 2013)
<b>RNA</b>	FEr Adiposito FPNh	KMOS, L28	NI	Alta eficiencia Aplicación clínica Tiempo de obtención reducido	Transfección diaria	Alta	~2	(Warren L. , y otros, 2010)
	FEh	OSKM, SV40T		Aplicación clínica Tiempo de obtención reducido			Citotoxicidad Respuesta Inmune	~0.05

	FPNh FDha	OSK con M y GLIS1		Aplicación clínica Alta eficiencia Transfección única	Vector de origen viral		~0.001-0.2	(Yoshioka, y otros, 2013)
<b>Micro RNA</b>	CHh	mir-302	NI	Aplicación clínica	Baja eficiencia	Alta	~0.006- 0.015	(Lin, y otros, 2011)
	FEr FFh	mirR302/367		Aplicación clínica Tiempo reducido de obtención Alta eficiencia	Involucra la formación de partículas virales		~10	(Anokey, y otros, 2011)
	CEAr	mir-2000c mir-302s mir369		Aplicación clínica	Cuatro transducciones cada 48 horas Baja eficiencia Involucra la formación de partículas virales		~0.03	(Miyoshi, y otros, 2011)
<b>Proteínas</b>	FEr	OSKM	NI	Aplicación clínica	Desarrollo difícil Baja eficiencia	Alta	~0.002- 0.006	(Zhou, y otros, 2009)
	FEh	OSKM			Desarrollo difícil y tardado Baja eficiencia		~0.001	(Kim, y otros, 2009)
	FEr	Desconocido			Desarrollo difícil y tardado Proteína desconocida implicada		~0.0005- 0.001	(Cho, y otros, 2010)
	FFh	NSK_NR5A2		Aplicación clínica Desarrollo sencillo	Baja eficiencia		~0.002	(Khan, y otros, 2013)
<b>Moléculas pequeñas</b>	FEr	VC6TFZN	NI	Alta eficiencia	Desarrollo tardado	Desconocida	~0.2	(Hou, y otros, 2013)

Tipo de Células: TFDha, fibroblasto dérmico humano adulto; FPNh, fibroblasto de prepucio neonatal humano; FEh, fibroblasto embrionario humano; CD34 + SCU, CD34 + de células de sangre del cordón umbilical; CD34 + SP, CD34 + desde periférico sangre; Ad, células madre derivadas de tejido adiposo; CPD, línea celular de pulpa dental; CMSP, célula mononuclear de sangre periférica; FEr, fibroblasto embrionario de ratón; CHF, células del hígado fetal; QEH, queratinocito epidérmico humano; CFh, célula del folículo del pelo humano; CEAr, célula estromal adiposa de ratón. Factores de reprogramación: K, KLF4; L28, LIN28; M, MYC; N, NANOG; O, OCT3/4; S, SOX2; SV40T, SV40 Antígeno T; TP53, shRNA para TP53; NR5A2, receptor nuclear 5A2; VC6TFZN: V, ácido valproico; C, CHIR99021; 6, 616 452; T, tranilcipromina ; F, forskoline; Z, DZNep; N, TTNPB. Tipo de acción: I, sistema integrativo; NI, sistema no integrativo.

La necesidad de encontrar una técnica que permita la reprogramación de células somáticas de manera segura, ha provocado una avalancha de propuestas, cada una de ellas con pros y contras, no se ha definido una que subsane todos los requerimientos tales como; la no integración del genoma huésped, una alta eficiencia y calidad, mínimos cambios epigenéticos, accesibilidad económica, corto tiempo de proceso, obtención en masa, aplicación a nivel industrial, entre otros. Por el momento el uso de virus Sendai es el más aceptado, ya se han obtenido cultivos de iPSC con una eficiencia mayor que en las otras técnicas y el grado de integración al genoma huésped es nulo. Su desventaja es el tiempo de proceso. Se espera que las metodologías evolucionen y cada vez sean más seguras para el paciente, haciendo del tratamiento específico una opción común.

## 5.0 Aplicaciones Generales de las iPSC

Desde el desarrollo de la tecnología de células troncales pluripotentes inducidas (iPSC) hace más de una década, se han logrado enormes avances en biología de células troncales y medicina regenerativa. Las iPSC humanas se han utilizado ampliamente para el modelado de enfermedades, el descubrimiento de fármacos y el desarrollo de la terapia celular. Se han aclarado nuevos mecanismos patológicos, nuevos fármacos que se originan a través de estas células pluripotenciales y los ensayos clínicos con productos derivados de su progenie ya han sido iniciados (Figura 28).

Estos enfoques se están volviendo cada vez más populares, debido a las ventajas que ofrecen las iPSC humanas, tal como su origen humano, fácil accesibilidad, capacidad de expansión, capacidad para dar lugar a casi todos los tipos de células deseados, evitar las preocupaciones éticas asociadas con las CTE humanas y el potencial para desarrollar medicamentos personalizados utilizando iPSC específicos para cada paciente. Además, los avances recientes con las tecnologías de edición de genes, en particular la tecnología CRISPR / Cas9, están permitiendo la rápida generación de modelos de enfermedades basadas en iPSC humanas definidas genéticamente.

La tecnología de iPSC también ha atraído un interés considerable en su aplicabilidad potencial para la medicina regenerativa. El primer estudio clínico con células derivadas de iPSC humanas se inició en 2014, se utilizaron células del epitelio pigmentario retinal, derivadas de iPSC humanas para tratar la degeneración macular, y se informó que mejoró la visión del paciente. Si bien el estudio clínico se suspendió posteriormente debido a la identificación de dos variantes genéticas en las iPSC del paciente, se espera que el ensayo se reanude (Shi, Haruhisa, C. Wu., & Yamanaka, 2017).

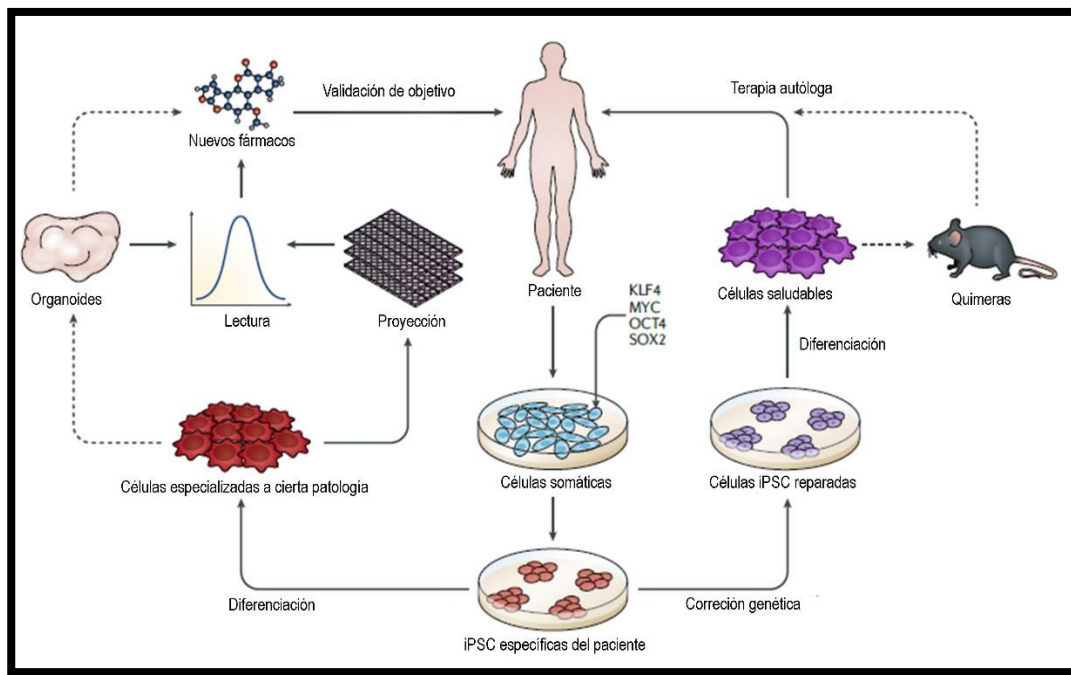


Figura 28. Aplicaciones de las iPSC. Tomada de (Grant Rowe & Daley, 2019)

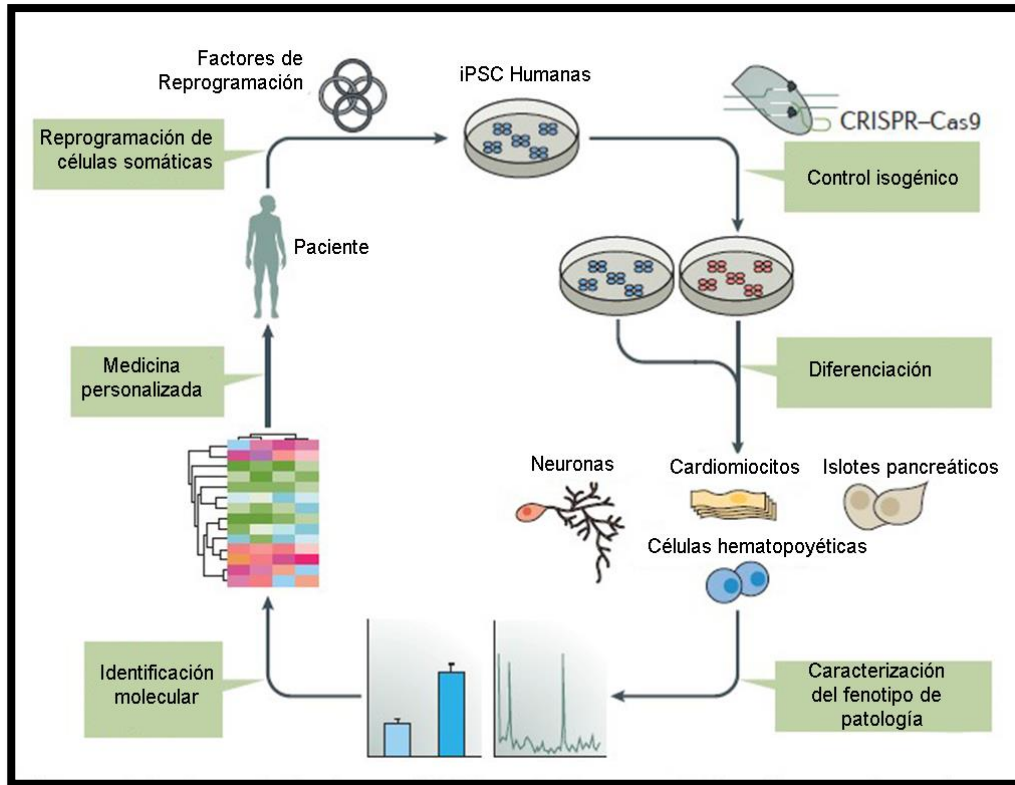
### ***5.1 Modelado de Enfermedades Basado en iPSC***

El tratamiento de muchas enfermedades es difícil debido a la falta de información sobre los mecanismos que desempeñan un papel en la progresión de la enfermedad. Por esta razón, es necesario modelar las enfermedades para que se pueda desarrollar el tratamiento dirigido a la causa principal de la enfermedad. El uso de iPSC para el modelado de enfermedades se basa en el hecho de que estas células tienen propiedades intrínsecas de auto renovación y el potencial para diferenciarse en casi cualquier tipo de célula en el cuerpo, tales como neuronas y cardiomiocitos que antes eran inaccesibles. Además, una iPSC específica para el paciente podría ser de gran utilidad en lo que se refiere al desarrollo de un tratamiento particular. (Singh, Kalsan, Kumar, Saini, & Chandra, 2015)

El modelado de enfermedades utilizando iPSC humanas comienza por derivar iPSC que contienen la(s) mutación(es) causante de la enfermedad a modelar. Las células resultantes se utilizan para revelar la etiología de la enfermedad e identificar mecanismos patológicos. En los primeros estudios de modelos de enfermedades basados en iPSC, las iPSC derivadas de individuos no afectados por enfermedades se utilizaron como controles para las iPSC derivadas de pacientes. Sin embargo, al igual que otras células, las iPSC han mostrado variaciones línea a línea, lo que complica la interpretación de los datos porque uno tiene que distinguir la variación línea a línea de los fenotipos verdaderos relevantes para la enfermedad.

Las tecnologías de edición del genoma de rápido desarrollo ahora permiten la introducción de cambios genéticos en iPSC de una manera específica, incluida la corrección de mutaciones genéticas causantes de enfermedades en iPSC derivadas de pacientes e introducción de mutaciones específicas en iPSC no afectados por enfermedad. Estos enfoques permiten la generación de líneas iPSC isogénicas genéticamente emparejadas con la mutación introducida como la única variable, lo que garantiza la identificación confiable de la verdadera patología y evita la confusión con cualquier disparidad en el fondo genético o epifenómenos resultantes de posibles variaciones línea a línea.

La tecnología CRISPR / Cas9 en particular ha atraído mucha atención y ha ganado un amplio uso en la edición de genes de las CTE y las iPSC humanas debido a su simplicidad en el diseño y facilidad de uso. Esta tecnología de edición de genes permite a los investigadores introducir mutaciones que causan enfermedades en las iPSC y eliminar tales mutaciones en las iPSC de pacientes para crear controles isogénicos para el modelado de enfermedades basado en iPSC (Figura 29).



**Figura 29. Modelado de enfermedades basado en iPSC humanas.** Modificada de (Shi, Haruhisa, C. Wu., & Yamanaka, 2017)

El modelado de enfermedades basado en iPSC se usa ampliamente para estudiar trastornos causados por una mutación de un solo gen (trastornos monogénicos) que tienen un inicio temprano, dada que la relativa inmadurez de las células diferenciadas de las iPSC, existe una mayor confianza de que los fenotipos de las células diferenciadas de las iPSC proporcionan un buen modelo para enfermedades de inicio temprano versus inicio tardío, por lo que el envejecimiento celular puede ser importante en la patología de la enfermedad.

Modelar enfermedades que tienen un inicio tardío es más desafiante, porque las células diferenciadas de las iPSC humanas en general exhiben propiedades fetales. Sin embargo, el envejecimiento celular inducido se ha utilizado para ayudar en el modelado exitoso de enfermedades de inicio tardío. Una forma de inducir el envejecimiento en células diferenciadas de las iPSC humanas es tratar las células con factores estresantes celulares, incluidos los compuestos que tienen como objetivo la función mitocondrial o la degradación de proteínas, como la piraclostrobina y MG-132. Otra forma de inducir el envejecimiento celular es expresar ectópicamente los productos génicos que inducen el envejecimiento prematuro, como la progerina.

Las interacciones entre diferentes tipos de células se pueden modelar mejor utilizando organoides 3D, se han utilizado para modelar enfermedades y el desarrollo de órganos humanos, probar compuestos terapéuticos y trasplante de células. Se han generado organoides para múltiples órganos, incluidos el

cerebro, la retina, el intestino, el riñón, el hígado, los pulmones y el estómago, utilizando tanto células madre de tejido diferenciado como células madre pluripotentes de ratones y humanos. Los organoides derivados de iPSC humanas (Cuadro 5) se han desarrollado para una variedad de aplicaciones debido a su parecido con la organización celular endógena y la estructura orgánica, y son particularmente útiles porque permiten la posibilidad de estudiar las interacciones célula-célula en un contexto celular que imita la fisiología y el desarrollo humanos (Shi, Haruhisa, C. Wu., & Yamanaka, 2017).

**Cuadro 5 Organoides derivados de iPSC humanas para investigación de modelado de patologías.**

<b>Organoide</b>	<b>Aplicación</b>	<b>Referencias</b>
<b>Organoide Cerebral</b>	Modelado de trastornos del espectro autista	(Mariani, y otros, 2015)
	Modelado de la infección por virus Zika	(Garcez, y otros, 2016)
	Modelado del síndrome Seckel	(Gabriel, y otros, 2016)
	Modelado de Linsencefalia de Miller-Dieker	(Bersteyn, y otros, 2017)
	Modelado de Glioblastoma	(Bian, y otros, 2018)
<b>Organoide Cerebral de regiones específicas</b>	Modelado de la infección por virus Zika, futura aplicación que incluye el modelado del desarrollo del cerebro humano y las enfermedades, y pruebas de medicamentos	(Qian, y otros, 2016)
<b>Organoide Quístico</b>	Modelado de síndrome de Alagille, enfermedad hepática poliquistica y colangiopatía asociada a la fibrosis quística, y validación de fármacos	(Sampaziotis, y otros, 2015)
	Estudio del desarrollo biliar y fibrosis quística	(Ogawa, y otros, 2015)
<b>Organoide Pulmonar</b>	Estudio del desarrollo pulmonar. Las aplicaciones futuras incluyen el modelado de enfermedades pulmonares	(Dye, y otros, 2015)
	Modelado de síndrome de dificultad respiratoria.	(Jacob, y otros, 2017)
<b>Organoides Renales</b>	Modelado de enfermedades renales, la detección de nefrotoxicidad y la terapia celular	(Takasato, y otros, 2015)
<b>Organoide Retinal</b>	Modelado de glaucoma	(Tucker, y otros, 2014)
<b>Organoide Gastrointestinal</b>	Modelado de la enfermedad de Hirshprung	(Workman, y otros, 2017)
	Modelado de proliferación epitelial	(Crespo, y otros, 2017)
<b>Organoide Cardíaco</b>	Modelado de Regeneración de Cardiomiocitos	(Voges, y otros, 2017)

Tomado de: (Shi, Haruhisa, C. Wu., & Yamanaka, 2017) y (Grant Rowe & Daley, 2019)



## 5.2 Desarrollo de Fármacos basado en iPSC

El desarrollo de medicamentos es un proceso complejo que implica una amplia gama de pasos que incluyen el descubrimiento de medicamentos, estudios preclínicos y clínicos, así como el cumplimiento normativo antes de que un medicamento se lance al público. Este proceso generalmente toma más de 10 años, y cuesta más de \$ 2 mil millones de dólares estadounidenses con una tasa de éxito de ~ 10% para llegar al área clínica (Hung, Khan, Lo, Hewitt, & Wong, 2017).

Las estrategias actuales de descubrimiento de fármacos dependen en gran medida de la disponibilidad de buenos modelos de enfermedades para las pruebas iniciales de fármacos in vitro o in vivo o ambas, antes de los ensayos clínicos (Figura 30).

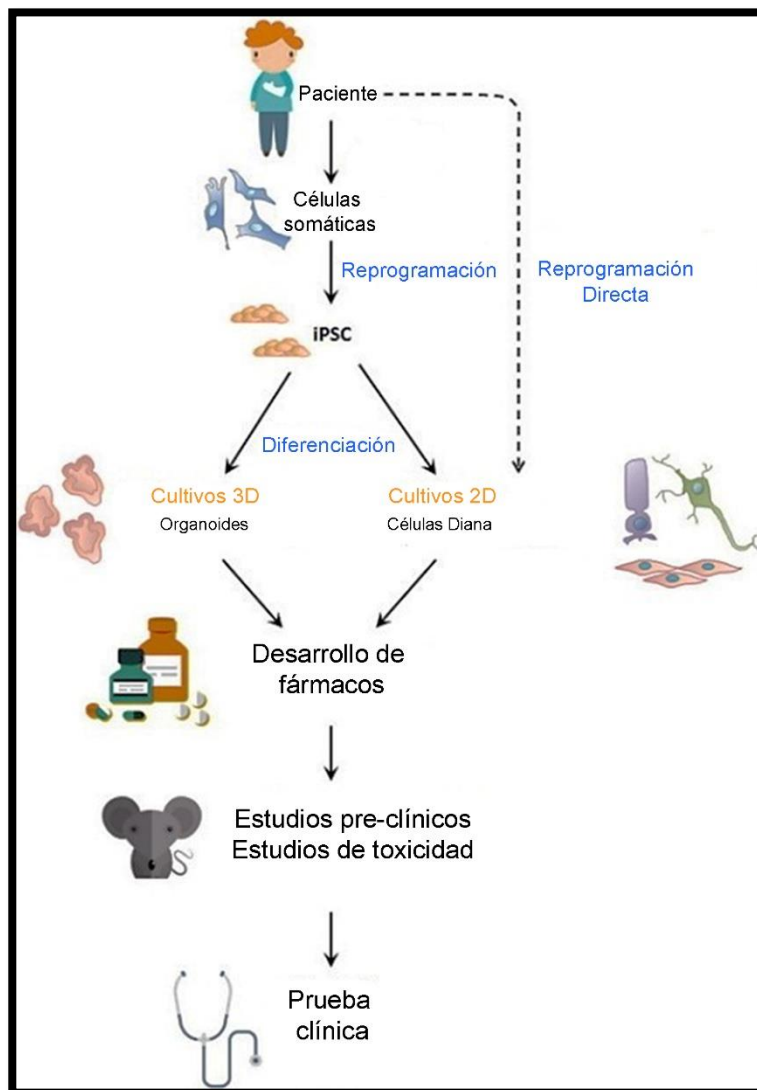


Figura 30. Desarrollo de medicamentos a través de iPSC. Modificada de: (Hung, Khan, Lo, Hewitt, & Wong, 2017)

En teoría, el mejor modelo sería utilizar las células afectadas por la enfermedad obtenidas directamente del paciente, pero esto generalmente no es posible en la mayoría de los casos debido a la falta de accesibilidad del tejido afectado, la cantidad de células requeridas para la selección de fármacos y la naturaleza de la progresión de la enfermedad, para superar estos problemas, los investigadores utilizaron sistemas alternativos como modelos animales diseñados y líneas celulares inmortalizadas en un intento por recapitular la patogénesis de la enfermedad. Aunque estos modelos siguen teniendo sus deficiencias, principalmente por la diferencia de especie.

Con el desarrollo de las iPSC se abrió un gran campo para el desarrollo de nuevos medicamentos. En primer lugar, a diferencia de las células primarias, las iPSC representan una fuente ilimitada de células específicas del paciente para la prueba de medicamentos. En segundo lugar, los modelos de enfermedad de iPSC ofrecen una plataforma única donde la biología del paciente y los ensayos fisiológicamente relevantes pueden usarse para el descubrimiento preclínico de medicamentos. En tercer lugar, dado que estas células son de origen del paciente, las iPSC también tienen un enorme potencial para el desarrollo de una medicina personalizada, lo que permite el descubrimiento y la prueba de medicamentos en función de la composición genética de un paciente y las características específicas de la enfermedad.

Finalmente, dado que la iPSC se puede diferenciar en varios tipos de células, también existe la posibilidad de utilizar células derivadas de iPSC en un formato de "banco de tejidos" para realizar más pruebas de medicamentos. Los arreglos de tejidos de iPSC se pueden usar para facilitar estudios preclínicos adicionales para observar las características del fármaco, como la bioactividad y la toxicidad en tejidos no afectados por enfermedades para los posibles efectos secundarios. Este enfoque puede ayudar a acelerar el proceso de desarrollo de fármacos en los casos en que faltan modelos animales in vivo para la enfermedad (Cuadro 6).

En total, los modelos de enfermedad de iPSC representan una plataforma novedosa para el descubrimiento de fármacos, la optimización de fármacos y las pruebas que podrían mejorar significativamente la probabilidad de traducir con éxito los descubrimientos preclínicos a la clínica. En términos de desarrollo de medicamentos, los modelos iPSC son extremadamente valiosos como un sistema in vitro preclínico para el descubrimiento y validación de medicamentos (Hung, Khan, Lo, Hewitt, & Wong, 2017).

**Cuadro 6. Candidatos a medicamentos, derivadas de la investigación con iPSC, actualmente en ensayos clínicos.**

Medicamento	Patología	Modalidad	Compañía	Referencias
<b>BMS-98168 (IPN-007)</b>	Parálisis supranuclear progresiva	<i>Anticuerpo</i>	<i>Bristol-Myers</i>	(Bright, y otros, 2015)
<b>Ezogabine</b>	La esclerosis lateral amiotrófica	<i>Pequeña molécula</i>	<i>GlaxoSmithKline</i>	(McNeish, Gardner, Wainger, Woolf, & Eggen, 2015)
<b>RG7800</b>	Atrofia muscular en la columna	<i>Pequeña molécula</i>	<i>Roche</i>	(Naryshkin, y otros, 2014)

### 5.3 Reprogramación del Cáncer

El cáncer es una transformación poligénica de la célula que resulta en cambios en el funcionamiento de un patrón de genes que controlan los procesos bioquímico-fisiológicos, energéticos, del ciclo celular, estado epigenético y, más importante, en la pérdida de la respuesta normal a factores de regulación sistémica dentro del organismo. Uno de los avances importantes en cancerología es el descubrimiento de células troncales de cáncer: una pequeña fracción de la población tumoral con la capacidad de auto-renovarse (igual que las células adultas de tejido normal). Se busca que estas células troncales sean la clave para inducir en el resto del carcinoma propiedades normales. La metodología de reprogramación puede proponer una solución radical a este problema, ya que existen similitudes entre los procesos de reprogramación y carcinogénesis (Gazarian, 2013).

La conexión entre la oncogénesis y la pluripotencia inducida es comúnmente discutida por el hecho de que, durante la reprogramación, las células somáticas adquieren un potencial ilimitado de proliferación y capacidad de auto-renovación; ambas son características bien conocidas de células cancerosas transformadas, entre otras características están:

- La formación de teratomas ocurre en el 50% de los casos por una mutación en el gen p53, conocido como guardián del genoma. En forma similar, este gen es una barrera de la reprogramación, tal que el silenciamiento de p53 aumenta el porcentaje de células TPi a obtener.
- Las iPSC muestran una alta actividad de la telomerasa y el alargamiento de los telómeros, las cuales son características esenciales de las células cancerosas que facilitan el crecimiento del tumor.
- Las iPSC y el metabolismo de las células cancerosas son muy similares, ya que los niveles de metabolitos influyen directamente en la organización y transcripción de la cromatina.
- Los principales genes de pluripotencialidad involucrados en el proceso de reprogramación también desempeñan un papel central en la tumorigénesis.  
El cóctel de factores del Dr. Yamanaka, que permite la reprogramación de las células somáticas a un estado similar a células troncales, está compuesto de oncogenes conocidos, como c-Myc y Klf4,41,42 o genes que exhiben alta expresión en varios tipos de cáncer
- En la reprogramación inicial de iPSC, el Dr. Yamanaka y su equipo utilizaron genes oncogénicos (cMYC) para lograr la pluripotencialidad en células adultas.

Los análisis avanzados de este proceso de múltiples etapas serán extremadamente útiles para el reconocimiento de cambios moleculares específicos que las células reprogramadas y, en paralelo, las células cancerosas deben realizar para lograr el estado de las células madre. Estas modificaciones moleculares o celulares pueden servir como dianas terapéuticas en el tratamiento contra el cáncer (Czewinska, Mazerek, & Maciej, 2018).

## ***6.0 iPSC y su aplicación en la Medicina Regenerativa***

El concepto de medicina regenerativa ha cambiado desde sus inicios, los avances tecnológicos han provocado una diferencia entre los valores sociales y visión política a lo largo del mundo. Existen múltiples definiciones, pero todas son extensas y no son el tipo de cosas que los científicos, empresas o defensores pueden decir de manera sucinta cuando un ejecutivo farmacéutico, un ministro del gobierno o un miembro del público solicita una aclaración.

Clásicamente, la "regeneración" se utiliza para describir "el proceso en humanos por el cual la pérdida de tejido especializado se reemplaza por la proliferación de células especializadas no dañadas. En este sentido, el objetivo de la medicina regenerativa es regenerarse más fundamentalmente mediante la provisión de células, particularmente células madre que pueden estimular una regeneración más amplia.

La medicina regenerativa ha crecido a partir de una buena cantidad de actividad previa. Esto incluye cirugía, implantes quirúrgicos, como caderas artificiales, y andamios biomateriales cada vez más sofisticados. También se basa en procedimientos hospitalarios, como trasplantes de médula ósea y órganos, y se relaciona con la ingeniería de tejidos, siendo las células humanas, el foco central de todas estas actividades. Estas pueden ser somáticas, células madre adultas o derivadas de embriones, y ahora, principalmente las células troncales pluripotenciales inducidas, que se han reprogramado a partir de células adultas (Masson & Dunnill, 2008).

Un objetivo a largo plazo de la medicina regenerativa será utilizar la tecnología de iPSC para la terapia celular. Muchas enfermedades humanas, como el infarto de miocardio, la diabetes, la degeneración de la retina y la lesión de la médula espinal, se producen debido a la pérdida de células, la degeneración y / o la lesión. La esperanza es que los derivados de iPSC específicos del paciente se puedan usar para curar o aliviar los síntomas de una enfermedad degenerativa particular sin la necesidad de fármacos inmunosupresores y teóricamente con el trasplante de células específicas creadas a partir de iPSC autólogas. Las células que faltan se pueden reponer y reemplazar por células con los defectos corregidos. El potencial de desarrollo in vitro y el éxito de las iPSC en modelos animales revelan el principio de utilizar las iPSC humanas como fuente regenerativa para terapias de trasplante. De hecho, ya se ha demostrado que el trasplante de células diferenciadas derivadas de iPSC reduce los fenotipos de la enfermedad en modelos de ratón de anemia de células falciformes, deficiencia de plaquetas, enfermedad de Parkinson y lesión de la médula espinal (Csobonyeiva, Polak, Koller, & Danisovic, 2015).

Es un campo emergente interdisciplinario de investigación y aplicaciones clínicas centradas en la reparación, reemplazo o regeneración de células, tejidos o células. órganos para restaurar la función dañada resultante de cualquier causa, incluidos defectos congénitos, enfermedades, traumas y envejecimiento. Utiliza una combinación de varios enfoques tecnológicos que lo mueve más allá de las terapias tradicionales de trasplante y reemplazo (Masson & Dunnill, 2008).

## 6.1 Enfermedades Cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. Se clasifican en: hipertensión arterial (presión alta), cardiopatía coronaria (infarto de miocardio), enfermedad cerebrovascular (apoplejía), enfermedad vascular periférica, insuficiencia cardíaca, cardiopatía reumática, cardiopatía congénita y miocardiopatías. Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de defunción en todo el mundo. Cada año mueren más personas por alguna de estas enfermedades que por cualquier otra causa (OMS, 2018).

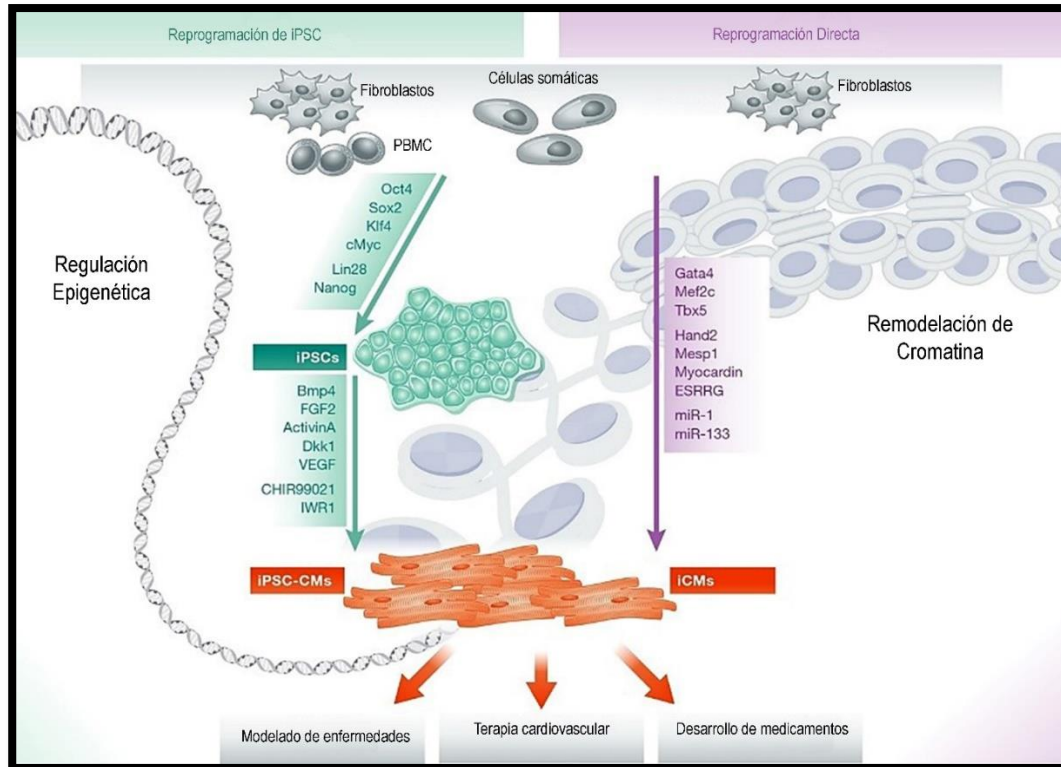
Debido a la alta mortalidad de las enfermedades cardiovasculares, estas representan objetivos importantes para la medicina regenerativa. Ya que las células del corazón carecen de capacidad para la auto-reparación, la recuperación una disfunción cardíaca lesionada requiere un reemplazo mediante trasplante con cardiomiocitos sanos, he ahí donde las iPSC pueden proveer cualquier célula cardíaca a partir de células ya diferenciadas del paciente (Figura 31). La primera obtención de cardiomiocitos a través de iPSC fue en el 2009, a partir de fibroblastos fetales reprogramados con Oct4, Sox2, Nanog y Lin28. Las células obtenidas expresaron proteínas de miofilamento y las proteínas de organización sarcomérica (p. Ej. A-actinina, miosina ligera y troponinas cardíacas) con los mismos perfiles de expresión que los cardiomiocitos derivados de CTEh (Murata, Tohyama, & Fukuda, 2010).

Hoy en día, los protocolos de diferenciación eficientes permiten la generación de grandes cantidades de poblaciones de cardiomiocitos altamente enriquecidas. En general, se han implementado tres estrategias de diferenciación de iPSC a cardiomiocitos: 1) ensayos de formación de cuerpos embrioides, 2) co-cultivo de iPSC indiferenciadas con una línea celular endodérmica visceral; y 3) una monocapa de PSC confluyente en presencia de factores de crecimiento cardiogénicos definidos (Abou Saleh, y otros, 2018) (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Métodos de diferenciación de cardiomiocitos a través de iPSC. *sadas***

<b>Formación de cuerpos embrioides</b>
<i>Es el método más común para generar CM a partir de iPSC, los ensayos implican el crecimiento de iPSC indiferenciadas en agregados en suspensión, lo que hace que formen estructuras llamadas embrioides, el suero en suspensión no es compatible con la pluripotencialidad y es suplementado de factores cardiogénicos específicos de cada etapa de cardiomiocitos. Las células obtenidas por este método generan potenciales de acción auricular, nodal y ventricular.</i>
<b>Co-cultivo de iPSC con una línea celular endodérmica visceral</b>
El endodermo visceral es una capa de células extraembrionarias que se forma en la etapa temprana del desarrollo embrionario y que secreta factores críticos involucrados en el desarrollo embrionario, se ha informado que el co-cultivo de iPSC humanas con células endodérmicas viscerales de ratón, pueden inducir eficientemente la diferenciación a CM.
<b>Monocapa de iPSC en presencia de factores de crecimiento cardiogénicos</b>
Este método consiste en la diferenciación directa de las iPSC hacia el linaje cardíaco mediante la adición secuencial de factores de crecimiento definidos que se sabe que inducen el desarrollo cardíaco en varios modelos animales. Esta adición secuencial de factores de crecimiento específicos apunta a recapitular, in vitro, el desarrollo embrionario del tejido del corazón. Se han empleado métodos para estimular las PSC humanas con rondas sucesivas de factores de crecimiento recombinantes, como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), BMP4, Wnt3 y Activina A, seguidos de la adición de DKK1 u otros inhibidores de Wnt, para inducir Diferenciación cardíaca.

Tomado de: (Abou Saleh, y otros, 2018)



**Figura 31. Programación de cardiomiocitos a partir de iPSC.** A partir de células específicas del paciente aisladas, como fibroblastos dérmicos o células mononucleares de sangre periférica se pueden generar cardiomiocitos mediante la reprogramación de iPSC y la subsiguiente diferenciación a iPSC-CM. O por medio de una reprogramación directa a células cercanas a la zona dañada del corazón. Tomada de (Abou Saleh, y otros, 2018)

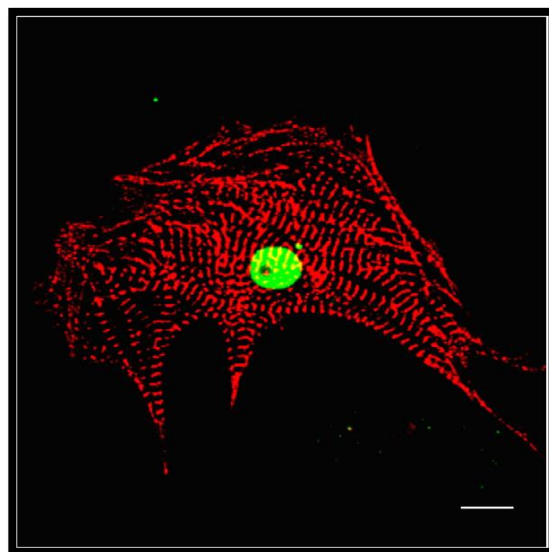
Se han reportado estudios que sugieren que el corazón es capaz de una regeneración endógena limitada, Si bien la proliferación del corazón puede ocurrir en menor medida durante la vida útil de un organismo, la división celular activa de los cardiomiocitos se limita a la etapa embrionaria. Una fuente diferente de regeneración cardíaca endógena es la población de células madre adultas residentes, conocidas como células progenitoras cardíacas, que se informa son capaces de diferenciarse y proliferar para reponer los cardiomiocitos apoptóticos. En general, las capacidades endógenas de proliferación y reparación del corazón no son suficientes para permitir la repoblación de áreas miocárdicas dañadas con nuevos cardiomiocitos después de un infarto al miocardio (Ebert, Diecke, Chen, & Wu, 2015).

Es por eso que un mecanismo por el cual la terapia celular pueda mejorar los resultados de una reparación cardíaca es de sumo interés. El injerto de células trasplantadas en el entorno del huésped, llevaría a la sustitución de cardiomiocitos dañados y tejido fibrótico, y restablecería el soporte estructural de las paredes ventriculares. Actualmente, el trasplante de corazón es la única terapia viable para la insuficiencia cardíaca en etapa terminal, pero sigue siendo problemático debido a una escasez crónica de suministro de órganos, así como al riesgo persistente de rechazo inmunológico. Una estrategia alternativa para la regeneración del miocardio dañado es explotar células terapéuticas como iPSC-CM para la construcción de estructuras 3D in vitro, y el posterior trasplante de estos parches cardíacos diseñados por ingeniería genética. Esta tecnología se conoce como "ingeniería de tejidos" o generación de músculo cardíaco

diseñado. El trasplante de un parche de tejido garantiza una mayor precisión de la administración en las áreas miocárdicas dañadas, así como la retención total del material trasplantado (Ebert, Diecke, Chen, & Wu, 2015).

Los investigadores han informado que el trasplante de iPSC-CM en los corazones infartados de roedores mejora la función cardíaca. De manera similar, se ha demostrado que las iPSC mejoran la función cardíaca en modelos de roedores de infarto al miocardio. Las iPSC injertadas pudieron restaurar el rendimiento contráctil, atenuar el remodelado vascular patológico y mejorar las propiedades electrofisiológicas, al tiempo que lograron la regeneración in situ de tejido cardíaco. Se utilizaron construcciones tridimensionales del corazón humano que consistían en iPSC-CM y células endoteliales para reparar grandes defectos cardíacos. Estas construcciones mejoraron notablemente la función cardíaca, con un aumento de la proliferación de miocitos, la vascularización y el acoplamiento eléctrico al corazón intacto (Abou Saleh, y otros, 2018).

Con la llegada de la tecnología iPSC las células troncales específicas del paciente se pueden desarrollar y expandir en una fuente de células indefinida. Los desarrollos posteriores en la biología cardiovascular han conducido a una diferenciación eficiente de los cardiomiocitos (CM), las células productoras de fuerza del corazón. Los iPSC-CM han proporcionado cantidades potencialmente ilimitadas de CM bien caracterizados, sanos y específicos de la enfermedad, lo que a su vez ha permitido e impulsado la generación y ampliación de tejidos cardíacos humanos fisiológicos y con enfermedades relevantes. Los fenotipos celulares fisiopatológicos de las cardiopatías hereditarias genéticamente, como las arritmias y las cardiomiopatías, se han modelado en placas de cultivo celular utilizando iPSC-CM específicas de la enfermedad. La angiogénesis terapéutica se ha convertido en el método más eficaz para curar vasos sanguíneos dañados debido a enfermedades isquémicas como el infarto de miocardio. Sin embargo, la implantación de células EC en el corazón infartado sigue siendo un reto (Gao, y otros, 2017).



**Figura 32 Diferenciación de cardiomiocito a partir de Célula Troncal Pluripotencial Inducida.** Inmunocitoquímica para el factor de transcripción específico para el corazón Nkx2.5 (verde) y la proteína sarcomérica  $\alpha$ -actinina (roja) en iPSC-CM. Barra de escala, 10  $\mu$ m. Tomada de (Murata, Tohyama, & Fukuda, 2010).

## 6.2 Enfermedades Neurodegenerativas

El desarrollo de las iPSC humanas ha llevado a tener una fuente ilimitada de células madre que superan los límites éticos de las células madre embrionarias humanas, su mayor disponibilidad ha llevado a un aumento notable en la comprensión de los mecanismos de la enfermedad. Esto es particularmente cierto para las enfermedades neurodegenerativas (Cuadro 8), ya que es imposible recuperar células neurales de los propios pacientes (Bardoni, y otros, 2018).

Gracias a la terapia con células troncales, es posible no solo retrasar la progresión de enfermedades neurodegenerativas incurables como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Huntington, sino también, lo que es más importante, eliminar el origen del problema. En neurociencia, el descubrimiento de células troncales neurales ha anulado la idea anterior de que el sistema nervioso central adulto no era capaz de neurogénesis. A partir de iPSC se puede desarrollar un enfoque basado en células troncales neurales para tratar diversos trastornos neurodegenerativos. Sin embargo, esta terapia aún se encuentra en una fase experimental (Zakrzewski, Dobrzynski, Szymonowicz, & Rybak, 2019).

**Cuadro 8 Principales enfermedades neurodegenerativas en las que hay aplicación de la medicina regenerativa a través de las iPSC.**

Enfermedad Neurológica	Descripción
<b>Alzheimer</b>	Es un trastorno neurodegenerativo relacionado con la edad que se caracteriza por la pérdida de la memoria, el deterioro cognitivo, los cambios de comportamiento y la incapacidad para realizar actividades de la vida diaria Estos déficits cognitivos se derivan de las interrupciones de la actividad de la red neural causada por la retracción de la dendrita, la columna dendrítica y la degeneración de la sinapsis, y la muerte de las <u>neuronas colinérgicas</u> en el cerebro anterior y la II capa de la corteza entorrinal
<b>Parkinson</b>	Es un trastorno neurodegenerativo de inicio en adultos caracterizado por bradicinesia, rigidez, trastornos de la marcha y temblor en reposo. Estos déficits motores son el resultado de la muerte de las <u>neuronas dopaminérgicas</u> y las interrupciones en la transmisión sináptica de la dopamina en la región para compacta de la sustancia negra. Esta degeneración progresiva en todo el cerebro se asocia con el inicio de la demencia, la disfunción autonómica y la inestabilidad postural grave.
<b>Esclerosis lateral amiotrófica</b>	Es una enfermedad multifactorial de inicio en adultos caracterizada por la degeneración de las <u>neuronas motoras</u> superiores en la corteza motora y las neuronas motoras inferiores localizadas en el tronco encefálico y el asta ventral de la médula espinal. A medida que los axones de estas neuronas motoras se retraen y eliminan las sinapsis neuromusculares, la neuro inflamación desencadena la astrogliosis reactiva y la proliferación de microglía. Esta degeneración progresiva



	se manifiesta como atrofia muscular, fasciculaciones, hiperreflexia, espasticidad y capacidad reducida para iniciar movimientos voluntarios
<b>Huntington</b>	Es un trastorno neurodegenerativo progresivo con un inicio promedio que oscila entre los 35 y los 42 años de edad. Los cambios iniciales en la función cognitiva progresan hacia inestabilidad física, movimientos involuntarios, arrebatos emocionales y alteraciones del pensamiento abstracto. Aunque las <i>neuronas del estriado</i> son las más afectadas, también se observa una muerte generalizada de neuronas en la corteza, el globo pálido y los núcleos talámicos. Estas neuronas experimentan cambios patológicos como la retracción de dendritas, el encrespamiento, la ramificación y la arborización, lo que podría indicar la activación de los mecanismos de supervivencia antes de la muerte de las neuronas.

Tomado de (Smith, He, Zhang, & Zheng, 2017)

Un objetivo central de la medicina regenerativa es la reconstrucción de los tejidos neuronales dañados por trastornos neurodegenerativos relacionados con la edad. (Cuadro 9) Sin embargo, una alta propensión a la formación de teratoma in vivo limita inherentemente la utilidad terapéutica de estas células.

Para afrontar este problema y demostrar la viabilidad clínica, se hay llevado a cabo estudios donde los progenitores neurales específicos derivados de iPSC, se trasplantaron a una médula espinal de primate no humana lesionada sin presentarse la formación de tumores. Además, la sobreexpresión de SOX2 mediada por lentivirus en el cerebro y medula espinal de ratón induce células de neuroblastos no tumorigénicos preparados para diferenciarse en neuronas funcionales. También se ha realizado trasplante de neuronas dopaminérgicas derivadas de iPSC humanas en un modelo de primate con enfermedad de Parkinson. Estos estudios in vivo demostraron que se pueden inducir neuronas funcionales en el sistema nervioso central adulto y que el trasplante en pacientes con enfermedades neurodegenerativas puede ser clínicamente aplicable (Smith, He, Zhang, & Zheng, 2017).

**Cuadro 9. Metodologías de reprogramación neuronal in vivo, para generar neuronas de diversos tipos.**

Célula de origen	Factores de Reprogramación	Célula final	Referencia
<b>Astrocito cortical</b>	NEUROD1	<b>Neurona glutamatérgica</b>	(Guo, y otros, 2014)
<b>Célula glial cortical NG2</b>	NEUROD1	<b>Neurona glutamatérgica</b>	(Guo, y otros, 2014)
<b>Célula glial cortical NG2</b>	NEUROD1	<b>Neurona GABAérgica</b>	(Guo, y otros, 2014)
<b>Célula glial estriatal</b>	NEUROG2 +/- FGF2 +EGF	<b>Neurona GABAérgica</b>	(Grande, y otros, 2013)
<b>Célula glial cortical</b>	NEUROG2 +/- FGF2 +EGF	<b>Neurona glutamatérgica</b>	(Grande, y otros, 2013)

<b><i>Astrocyto espinal</i></b>	SOX2	<b><i>Neuroblasto</i></b>	(Grande, y otros, 2013)
<b><i>Neurona de cuerpo calloso</i></b>	FEZF2	<b><i>Neurona cortical</i></b>	(Rouaux & Arlotta, 2013)
<b><i>Neurona espinal</i></b>	FEZF2	<b><i>Neurona piramidal</i></b>	(De la Rossa, y otros, 2013)
<b><i>Fibroblasto</i></b>	ASCL1, POU3F2, MYTIL, OTX2, LMX1A, LMX1B Y FOXA2	<b><i>Neurona dopaminérgica</i></b>	(Torper, y otros, 2013)

### 6.3 Inmunodeficiencia

La inmunodeficiencia es un estado patológico en el que el sistema inmunitario no cumple con el papel de protección que le corresponde, dejando al organismo vulnerable a padecer infecciones y una mayor prevalencia de cáncer. Existen tanto inmunodeficiencias primarias y secundarias, las inmunodeficiencias primarias son aquellas que se presentan desde la infancia y se deben a efectos congénitos, comprenden más de 150 trastornos distintos del desarrollo y/o función del sistema inmunitario y las inmunodeficiencias secundarias o adquiridas son el resultado de factores externos tales como la desnutrición, cáncer o algunas infecciones. El estudio de este tipo de patologías se ha basado en gran medida en estudios in vitro que utilizan células derivadas de pacientes y en el análisis sobre modelos animales adecuados, ya que muchas formas de inmunodeficiencias son raras, graves y afectan predominantemente a bebés y niños pequeños, lo que provoca una dificultad al acceso de las muestras biológicas de dichos pacientes (Pessach, y otros, 2011).

Las iPSC presentan una opción para subsanar estas dificultades, ya que, a partir de una célula madura de fácil extracción como los fibroblastos, se puede acceder a una infinidad de células inmunológicas. (Figura 33) Con esto en mente, se han establecido bancos de líneas celulares de fibroblastos dérmicos de más de 60 pacientes con diversas formas de inmunodeficiencias primarias. Este repositorio de líneas se ha utilizado para establecer un conducto para la producción sistemática de iPSC específicas de inmunodeficiencias, lo que proporciona grandes oportunidades de investigación (Pessach, y otros, 2011).

Otro linfocito, la célula T Natural Killer (NK), es conocido no solo por secretar citocinas Th1 para generar actividad antitumoral, sino también por desempeñar múltiples funciones en la regulación de las respuestas inmunitarias, como las involucradas en la inmunidad antiviral y el rechazo de trasplantes. Sin embargo, la adquisición de números adecuados de células NK de pacientes para inducir respuestas inmunes efectivas es actualmente un obstáculo para la inmunoterapia, que podría abordarse utilizando iPSC como una fuente renovable de células NK. A partir de esto se han obtenido células NK funcionales a partir de iPSC, las cuales producían altos niveles de IFN- $\gamma$  incluso sin expresar fenotipos de la superficie celular madura, cumpliendo el efecto adyuvante que las células NK tienen en las respuestas antitumorales (Jiang, Han, & Cao, 2014).

La tecnología de iPSC presenta un camino opcional también para la vacunación. Funcionalmente equivalente a las CTEh en muchos aspectos, las iPSC pueden manipularse genéticamente o químicamente in vitro para convertirse en células B de memoria que secretan varios anticuerpos funcionales, que en última instancia pueden ser transfundidos al ser humano. Dado que todo este proceso puede ocurrir fuera del cuerpo humano, muchos de los posibles efectos secundarios adversos se eliminan, lo que proporciona una forma más segura de administrar la protección de la vacuna. Este método de vacunación basado en células B de memoria derivado de iPSC sería más beneficioso para poblaciones específicas en las que el método de vacunación tradicional no es adecuado, como las enfermedades autoinmunes (Jiang, Han, & Cao, 2014).

Debido al número cada vez mayor de infecciones graves por patógenos resistentes a múltiples medicamentos en todo el mundo destaca la necesidad de opciones de tratamiento alternativas. Dado el papel fundamental de los fagocitos y especialmente los macrófagos alveolares en la inmunidad pulmonar, se ha introducido una nueva estrategia de tratamiento basada en células del sistema inmune aplicadas para atacar las infecciones bacterianas de las vías respiratorias. Para obtener los números de células necesarias para el tratamiento, se han llevado a cabo una producción en masa de fagocitos terapéuticos a partir de iPSC en biorreactores, donde se indujo la formación de complejos formadores de células mieloides a partir de cuerpos embrionarios. Los macrófagos derivados de iPSC se obtuvieron luego de 10-15 días y se lograron cosechar semanalmente hasta por 3 meses. Esta técnica puede dar un paso al cultivo en masa de una gran diversidad de células para diversos linajes, ya sea para tratamiento directo de patologías o modelado de enfermedades (Ackermann, y otros, 2018).

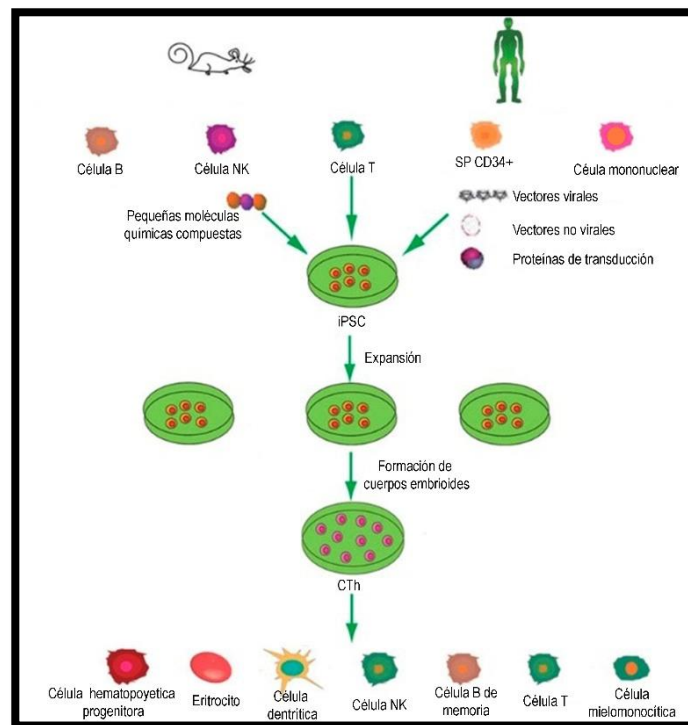
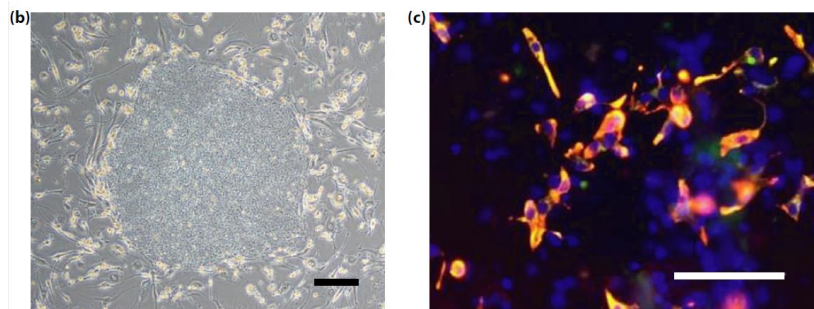


Figura 33. Aplicación de iPSC a trastornos de inmunodeficiencia. Tomada de (Jiang, Han, & Cao, 2014)

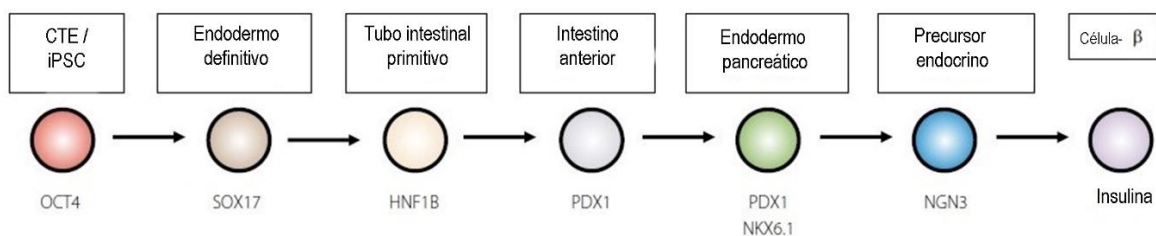
## 6.4 Diabetes

La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción de las células  $\beta$  en el páncreas, la deficiencia de insulina y los niveles persistentes altos de glucosa en la sangre. Aunque la suplementación con insulina exógena es un tratamiento que salva vidas, todavía es difícil obtener un control fisiológico de los niveles de glucosa en la sangre. Uno de los tratamientos alternativos más certeros, es el trasplante de células  $\beta$  pancreáticas, por medio de trasplantes de islotes obtenidos de donantes con muerte cerebral o paros cardíacos a través de la vena porta. Aunque se requiere una cantidad suficiente de islotes de múltiples donantes, se ha demostrado que este tratamiento permite a los pacientes retirarse de la terapia de inyección de insulina. La escasez de donantes puede ser solucionado a partir de las iPSC, ya que tienen la capacidad de auto-renovarse indefinidamente y diferenciarse en cualquier tipo de célula del cuerpo, también se presentan menos problemas éticos que con el uso de CTE. (Kondo, Toyoda, Inagaki, & Osafune, 2018)



**Figura 34. CPTi y células secretoras de insulina derivadas de iPSC.** b) iPSC derivadas de un paciente con diabetes tipo I, 300  $\mu\text{m}$  y c) células secretoras de insulina diferenciadas a partir de iPSC 100  $\mu\text{m}$ . Tomada de (Kondo, Toyoda, Inagaki, & Osafune, 2018).

Para inducir la diferenciación de iPSC en células del linaje pancreático, se ha adoptado una estrategia para imitar y reproducir las etapas normales de desarrollo del páncreas in vitro mediante el uso de la expresión de factores de transcripción clave involucrados en el desarrollo del páncreas. (Figura 35) Estas etapas incluyen: a) la formación del endodermo definitivo caracterizado por la expresión de SOX 17 y FOXA2, b) la inducción del endodermo pancreático caracterizada por la expresión de PDX1 y HNF6, c) formación de precursores endocrinos resaltada por inducción de NGN3 y NEUROD1 y eventual progresión a d) linaje de células  $\beta$  marcado por la expresión de insulina, NKX6.1 y Mafa. (Matveyenko & Vella, 2015)

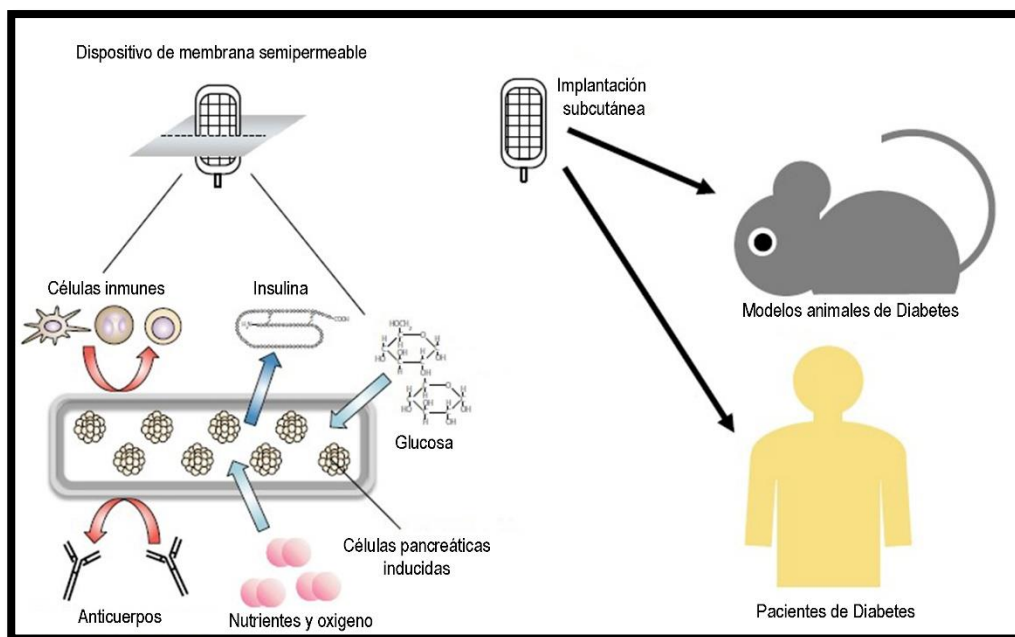


**Figura 35. Diagrama de la diferenciación estratégica para producir células pancreáticas a partir de iPSC por medio de un desarrollo in vitro.** Se muestran las etapas de desarrollo y sus genes marcadores correspondientes. Fuente (Kondo, Toyoda, Inagaki, & Osafune, 2018).

En general, las estrategias de trasplante de células pancreáticas, se clasifican en dos: (I) un método en el que los tejidos pancreáticos inducidos se implantan directamente en el cuerpo del paciente; y (II) otro en el que se implanta un dispositivo que contiene tejidos pancreáticos

En el primer método, previamente se tiene que inducir la angiogénesis en los sitios de implantación para promover el injerto y la supervivencia a largo plazo de las células implantadas. Al inducir la formación de redes vasculares en el sitio de implantación, se implantan células pancreáticas después de que disminuyen las reacciones inflamatorias, lo que crea un entorno más tolerable para las células implantadas. En el segundo método de trasplante, las células pancreáticas están encapsuladas por un dispositivo de bioingeniería que incluye membranas semipermeables. El oxígeno y los nutrientes pueden pasar para promover la supervivencia, la diferenciación y la maduración de las células. Además, debido a la vasculogénesis alrededor de los dispositivos, las células  $\beta$  diferenciadas pueden segregar insulina en respuesta a los cambios en las concentraciones de glucosa (Figura 36).

Se espera que estos métodos de implantación basados en dispositivos reduzcan o eliminen la necesidad de agentes inmunosupresores. Además, estos métodos tienen potencialmente la ventaja de eliminar las células implantadas con el dispositivo del cuerpo del paciente cuando ocurren eventos adversos, como tumorigénesis o disfunción (Kondo, Toyoda, Inagaki, & Osafune, 2018).



**Figura 36. Métodos de trasplante de células pancreáticas derivadas de iPSC.** Las células pancreáticas derivadas de iPSC o CTE encapsuladas con dispositivos inmunoprotectores se implantan en los modelos de animales con diabetes o pacientes con diabetes. El oxígeno, los nutrientes, la insulina y la glucosa pueden pasar a través de la membrana porosa del dispositivo para promover la supervivencia, diferenciación, maduración y secreción de insulina sensible a la glucosa de las células pancreáticas encapsuladas. En contraste, las células o moléculas inmunes, como los anticuerpos y los complementos, no pueden pasar, lo que evita el rechazo inmune o las respuestas autoinmunes contra las células. Tomada de (Kondo, Toyoda, Inagaki, & Osafune, 2018).

La investigación básica sobre estrategias de terapia celular para la diabetes con células madre ha avanzado considerablemente en la última década. La generación de tejidos pancreáticos funcionales a partir de células troncales pluripotentes inducidas humanas se ha hecho posible, y estas células podrían reemplazar los islotes donantes utilizados en el trasplante de islotes. En la próxima década, se espera que muchos tratamientos experimentales de diabetes se confirmen por su eficacia y seguridad terapéutica. (Cuadro 10)

**Cuadro 10. Generación de células tipo B positivas para insulina a partir de iPSC.** *INS+*, células positivas a insulina; *GCG+*, células positivas a glucagón; *SST+*, células positivas a somatostatina; *n.a.*, no aplica; *n.d.* no determinado.

Tipo de Células Inducidas	Porcentaje de insulina	Secreción de insulina estimulada por glucosa	Receptores / sitio de trasplante	Mejoría de la hiperglucemia	Referencia
<i>INS+</i> , <i>SST+</i>	25%	<i>Si (in vitro)</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.d.</i>	(Zhang, y otros, 2009)
<i>INS+</i> , <i>GCG+</i> , <i>SST+</i>	11.8% (8.0-16.9%)	<i>No</i>	<i>n.a.</i>	<i>n.d.</i>	(Kunisada, Tsubooka Yamazoe, Shoji, & Hosoya, 2012)
<i>INS+</i> , <i>GCG+</i> , <i>SST+</i>	50%	<i>Si (in vitro e in vivo)</i>	<i>Ratón diabético y ratón no diabético /capsula renal</i>	<i>Si</i>	(Rezania, y otros, 2014)
<i>INS+</i> , <i>GCG+</i> , <i>SST+</i>	30%	<i>Si (in vitro e in vivo)</i>	<i>Ratón diabético /capsula renal</i>	<i>Si</i>	(Pagliuca, y otros, 2014)
<i>INS+</i> , <i>GCG+</i> , <i>SST+</i>	<i>n.d.</i>	<i>Si (in vivo)</i>	<i>Ratón/ capsula renal</i>	<i>n.d.</i>	(Toyoda, y otros, 2015)
<i>INS+</i> , <i>GCG+</i> , <i>SST+</i>	24-27%	<i>Si (in vitro e in vivo)</i>	<i>Ratón diabético inducido/ capsula renal</i>	<i>Si</i>	(Millman, y otros, 2016)
<i>INS+</i> , <i>GCG+</i> , <i>SST+</i>	56%	<i>Lento (in vitro)</i>	<i>Ratón inmunodeficiente</i>	<i>Si</i>	(Manzar, Kim, & Zavazana, 2017)
<i>INS+</i> , <i>GCG+</i> , <i>SST+</i>	30-33.6%	<i>Si (in vitro)</i>	<i>Ratón diabético/ capsula renal</i>	<i>Si</i>	(Yabe, y otros, 2017)

Tomado de (Shahjalal, Abdal Dayem, Lin, Jeon, & Cho, 2018).

## ***7.0 Cuestiones Bioéticas y Jurídicas de iPSC***

El uso de células troncales o células madre, junto con la clonación y reproducción asistida, han sido de los temas que han producido mayor polémica en el ámbito bioético. Causando ajustes en leyes de diversos países, conflictos religiosos y debates éticos. Su asombrosa capacidad regenerativa produjo un alza de interés en la medicina regenerativa aun cuando los procedimientos de obtención por medio de la destrucción de embriones se mantenían en la cuerda floja de la bioética. Con el desarrollo de las iPSC surgió una gran solución la comunidad científica, se podían proseguir los estudios de células troncales sin necesitar de los embriones y aún mejor, a partir de una célula de fácil obtención se podía obtener un sinnúmero de linajes celulares.

### ***7.1 Situación internacional ético-jurídica de CTE y CTPí***

La controversia ética se mantuvo desde 1998, cuando se produjeron los primeros cultivos de células troncales humanas, derivadas de la destrucción de embriones tempranos para la obtención de dichas células pluripotenciales. A principios de la década anterior comenzaron a utilizarse en la investigación líneas de células embrionarias humanas de tres distintos orígenes:

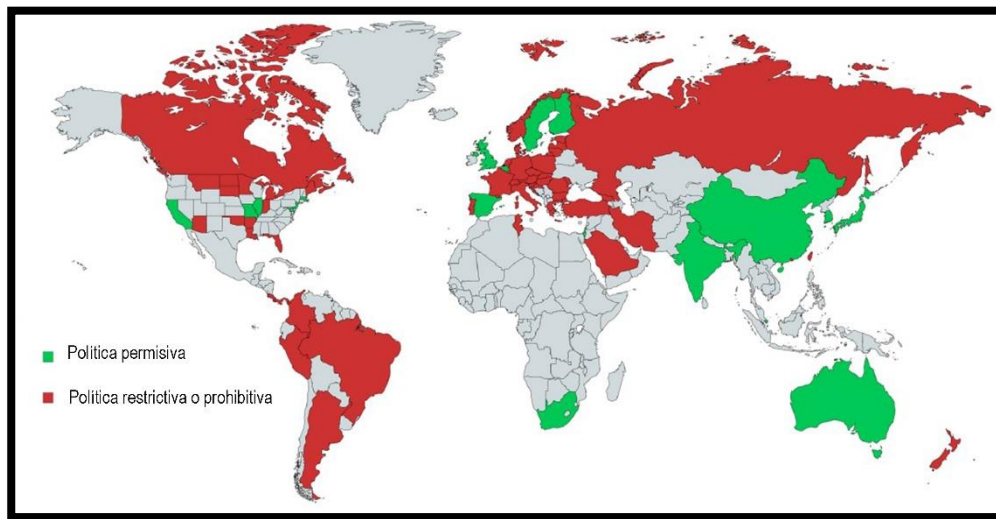
1. Los embriones producidos para fines reproductivos (reproducción asistida) que han sobrepasado los requerimientos para este fin y han sido donados a la investigación (incluye los embriones vendidos para la investigación, aunque esto podría ser ilegal en muchas jurisdicciones).
2. Embriones producidos específicamente para la investigación por fusión de gametos, que han sido donados o vendidos.
3. Embriones producidos por reemplazo nuclear (clonación terapéutica). (Cepero Noriega, Henández Hernández, & Carrero Texidor, 2011).

Estos orígenes provocaron a una serie de cuestiones éticas entre la comunidad científica, tales como determinar el punto en el que el embrión adquiere sus derechos como ser humano, los aspectos jurídicos sobre los donadores de dichas células, la identidad genética del embrión, el uso de embriones congelados por ser excedente en prácticas de reproducción asistida, el uso exclusivo de células madre para estudios de cuestiones terapéuticas, entre otros. La moralidad, religión y avance biomédico se mantiene en constante debate. Pero las metodologías y descubrimientos van haciendo modificaciones en leyes de algunos países.

Las diversas regulaciones se hacen siguiendo acuerdos internacionales y las necesidades de cada país soberano. Entre los textos internacionales más importantes que afectan a la aplicación de la tecnología biomédica, están: la Declaración Universal de Derechos Humanos de las Naciones Unidas (DUDH), de 1948; el Convenio Europeo para la Protección de los Derechos Humanos y las Libertades Fundamentales (CDEH) de 1950, el Convenio Internacional sobre Derechos Civiles y Políticos (CIDCP) de 1956 y el Convenio de las Naciones Unidas sobre Derechos del Niño (CDN) de 1989 (Gonzalez Espinoza, 2013).

Un ejemplo de los cambios normativos bioéticos es España, donde apartir del primer cultivo de células troncales del Dr. Thomson, se modifico la Ley 35/1988, donde se prohibia el uso de embriones humanos excedentes. En octubre del 2003 se aprobo la ley que regula el uso de embriones sobrantes aunque se limitaba el número de ovocitos y el de embriones a implantar, tambien ese año se creo el Comité Regional de Etica. Para el 6 de mayo del 2005 se aprobo la Ley de Reproducción Asistida, donde se elimino la restricción del número de ovocitos a implantar . Por otro parte, en EE. UU. no sólo se prohíbe rotundamente la clonación humana, tanto para fines reproductivos como terapéuticos, sino que prohíben el uso de las células embrionarias humanas de cualquier origen con fines científicos. La investigación con las células madre embrionarias humanas en este país corre a cargo exclusivamente de las empresas privadas (Gonzalez Espinoza, 2013).

Para el 2016 el 77% de los países con leyes acerca de las células troncales, mantienen políticas restrictivas o prohibitivas y las políticas permisivas que llegan a haber se definen como aquellas que permiten, específicamente células somáticas de transferencia nuclear bajo ciertas condiciones. La política restrictiva fue definida como una que prohíbe el uso de células troncales por transferencia nuclear, permite el uso de la investigación de células troncales humanas embrionarias utilizando embriones de fertilización in vitro o solo permite la investigación de células troncales humanas embrionarias en un número limitado de líneas. Y la política prohibitiva se definió como la total prohibición en la investigación sobre células troncales humanas embrionarias o sus productos (Figura 37) (Poulos, 2018).



**Figura 37. Mapa sobre políticas restrictivas, prohibitivas y permisivas, respecto al uso de Células Troncales.** Verde → políticas permisivas, rojo → políticas restrictivas o prohibitivas. Tomada de (Poulos, 2018).

Con el desarrollo de células troncales pluripotenciales inducidas (iPSC) humanas en 2007, se dio paso a una solución para el conflicto ético sobre el origen de células troncales, que anteriormente se obtenían de embriones. También dan paso a subsanar otras preocupaciones éticas, como el consentimiento informado y riesgos a la salud femenina al donar los óvulos para la formación de embriones. Otra ventaja de estas



células será la accesibilidad económica a un tratamiento específico, ya que la producción de iPSC es de menor costo que la de las CTE, al tener la posibilidad de ser producidas industrialmente en masa, bajaría el costo de tratamientos para cualquier usuario, independientemente de su posición socioeconómica. Eliminando preocupaciones sobre la distribución desigual de terapias médicas basadas en la riqueza.

Actualmente las iPSC mantienen una gran pluripotencialidad, pero no a tal punto de lograr el desarrollo total de un embrión, aun así, los científicos afirman que solo es cuestión de tiempo. Si esto logra a suceder, científicos y grupos éticos tendrán que plantearse si la creación de un embrión humano por iPSC, cambiaría su grado de humanidad o si es digno a una protección legal.

Aunque las iPSC presentan como células propias del paciente, se tienen riesgos, no solo de que se produzca patologías oncogénicas debido a la manipulación genéticas de dichas células, también que haya una manipulación al genoma humano. Se tiene el miedo de que dichos estudios den paso a investigaciones de clonación humana, mezclas genéticas humano-animales y otras creaciones que pongan en peligro la identidad humana (Brind'Amour, 2018).

## ***7.2 Situación ético-jurídica de CTPE y iPSC en México***

En México se presentan diversas confrontaciones bioéticas, la más conocida es la legalización del aborto, tales conflictos éticos van de la mano con la mentalidad conservadora-religiosa de la mayoría de la población, un 57% de la nación se consideran católicos y un 11.2% son Testigos de Jehová. (Sánchez, 2017) Es cierto que las cuestiones morales son de gran importancia, nos dan el camino para efectuar correctamente las investigaciones e invenciones para un bien social, aunque es innegable que un fanatismo solo provoca un retroceso científico.

Para bien o para mal, debido a la poca investigación de iPSC comparación de otros países, en México no se han desatado grandes debates en cuestión. Ya que no representa una gran amenaza religiosa-moral como el tema del aborto. Pero él no llegar a una solución igual limita el ámbito jurídico. La mayoría de establecimientos en México que manejan células troncales como medicina regenerativa y centros de investigación que mantiene una producción de iPSC, no se encuentran regulados por una ley o norma nacional específica a este tipo de células.

En nuestro país, el marco jurídico biomédico es regulado por: la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, la Legislación Sanitaria; Ley General de Salud y el Reglamento de Salud en Materia de Investigación y la Ley de Ciencia y Tecnología.

El artículo 3° constitucional reconoce el apoyo a la investigación a la libertad de investigación y según lo establece la Ley de Ciencia y Tecnología el gobierno federal está comprometido a impulsar, fortalecer y desarrollar la investigación científica y tecnológica del país. Por otra parte, el artículo 4° constitucional consagra como garantía social, el derecho a la protección de la salud (Brena Sesna, 2005). La Ley General de Salud define a las células germinales como las células reproductoras masculinas y femeninas capaces

de dar origen a un embrión. Esta Ley dispone que los establecimientos de salud dedicados a la disposición de células progenitoras o troncales requieren una autorización sanitaria (art. 315) y deben contar con un comité interno de trasplantes (art. 316), que el comercio de células (de cualquier tipo) está prohibido (art. 327) y que se requiere un permiso especial para sacarlas del territorio nacional (art. 317). Esta ley también hace mención a la utilización de sangre placentaria para obtener células troncales para usos terapéuticos o de investigación (art. 321Bi), pero no hay ningún precepto en este texto legal que se refiera a la utilización de células troncales de origen embrionario para la investigación (Brena Sesna, 2015).

Por otro lado, ley penal, en el Código Penal para el Distrito Federal (CPDF), dispone sanciones para quien utilice óvulos o espermatozoides con fines distintos a los autorizados por los donantes *“A quien disponga de óvulos o espermatozoides para fines distintos a los autorizados por sus donantes se les impondrá de tres a seis años de prisión y de cincuenta a quinientos días de multa.”*

A pesar de diversos avances tecnológicos, aun se presentan deficiencias enormes para una legislación especializada en células troncales. En único documento jurídico que llegaba a mencionar el tema de manipulación genética era el Código Penal para el Distrito Federal, (Brena Sesna, Células troncales, aspectos jurídico-filosóficos, 2005) ahora CDMX. En México, los partidos políticos han presentado una o varias iniciativas ante el Senado de la República y la Cámara de Diputados. Los conservadores del Partido Revolucionario Institucional (PRI), pero también corrientes del Partido Acción Nacional (PAN), se alinean por una prohibición absoluta, que conlleve incluso no permitir embriones sobrantes en las FIV para su congelación y posible utilización en investigaciones; los liberales, los partidos de izquierda, han propuesto la utilización de células troncales embrionarias en la investigación. Ninguna de las iniciativas presentadas se ha aprobado, especialmente por las distintas consideraciones de cuándo comienza la vida y, con ello, a partir de qué momento debe estar protegida jurídicamente (Brena Sesna, 2015).

El 26 de Agosto del 2016 se publicó el *Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-260-SSA1-2015, para la disposición de células troncales y progenitoras con fines terapéuticos y de investigación*. Dicha Norma tiene por objeto uniformar las actividades, criterios, estrategias y técnicas operativas en relación a la disposición de células troncales humanas. Su campo de aplicación se circunscribe al uso terapéutico de células troncales progenitoras hematopoyéticas y a la investigación de células troncales humanas no hematopoyéticas. (Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-260-SSA1-2015) A pesar del inicio de este proyecto y de la presión de diversas organizaciones como la Academia Nacional de Medicina de México, para regularizar urgentemente de este asunto, el proyecto sigue sin concluirse y seguimos sin una regulación clara para las células troncales y menos para células pluripotenciales inducidas (iPSC). Lo cual ha hecho de México un destino conocido por la oferta de “tratamientos con células madre”, los que se ofrecen sin validación científica rigurosa, sin detalles del tipo de células a administrar, sin parámetros objetivos de evaluación relacionados con la patología que se pretende tratar y sin el registro de ensayos clínicos (Cassan, 2018). Cada día son más los proyectos e investigaciones sobre células troncales y células pluripotenciales inducidas en nuestro país, ya sea en institutos de salud públicos y privados. Los avances siempre continúan y esperamos que el proyecto de la NOM-260-SSA1-2015 sea concluido, y que abarque la alternativa del uso de iPSC para poder avanzar a paso firme sobre estas interesantes células pluripotenciales.

## 8.0 Estudios de iPSC en México

Desde 1981 que el Dr. Martin Evans (Premio Nobel 2007), trabajó con roedores e identificó el potencial de las células troncales para regenerar diferentes tipos de órganos del cuerpo humano. Se desencadenó una serie de diversos estudios a nivel mundial y claro que México no fue la excepción.

Hoy en día, hay poco más de 20 grupos tanto en la ciudad de México, como en diversas ciudades del país están trabajando en la biología de las células troncales (CT) neurales, hematopoyéticas, mesenquimales, embrionarias, cancerosas, etc. El interés en las CT ha conducido al desarrollo de protocolos clínicos institucionales, en los que ya se han empleado fracciones celulares para el tratamiento de diversas enfermedades (Pelayo, Santa Olalla, & Velasco, 2011).

En México estas investigaciones iniciaron a mediados de la década de 1990, uno de los grandes pioneros de esa época es el Dr. Luis Covarrubias del Instituto de Biotecnología de la UNAM, quien se ha dedicado al estudio de las CT neurales en modelos murinos. Sus primeros estudios, publicados en 1995, coincidieron con la demostración de la existencia de células troncales neurales (CTN) en el cerebro adulto. Su investigación se ha enfocado también en la búsqueda de sistemas experimentales para obtener neuronas a partir de CTE. Otro aspecto en el que están trabajando, es la plasticidad de diferenciación de las CT Neuronales, ya sea por efecto del microambiente local, o por una reprogramación inducida

El Grupo de Investigación en Hematopoyesis y Células Troncales (GIHCT) del IMSS es otro de los grupos con más de 20 años trabajando en esta área. Este grupo fue iniciado por el Dr. Héctor Mayani, quien trabajando con el Dr. Peter Lansdorp (en Vancouver, Canadá), fue uno de los primeros en demostrar que las CT hematopoyéticas de la sangre de cordón umbilical poseen potenciales de proliferación y expansión muy superiores a los de las células hematopoyéticas de sujetos adultos. En 1994 se formó oficialmente el GIHCT y desde entonces se ha dedicado al estudio de las SC del sistema hematopoyético (Pelayo, Santa Olalla, & Velasco, 2011).

En el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, el Dr. Karlen Gazarian, se ha enfocado a la reprogramación celular y la generación de CT pluripotenciales inducidas (iPSC) a partir de células maduras de diferentes tejidos. Y en colaboración con el grupo del Dr. Vicente Madrid, del Instituto Nacional de Salud Pública, en Cuernavaca, Morelos, llevan a cabo investigaciones de la aplicación de las iPSC en la reprogramación del cáncer, especialmente el cáncer cervicouterino (Gazarian , 2013).

Para el 2009 se formó el Grupo Mexicano de Investigación de Células Troncales, el cual se encuentra constituido por investigadores de renombradas instituciones del país, cuya línea de investigación se encuentra enfocada al estudio de la Biología y la aplicación de las Células Troncales. Entre sus fundadores se encuentra el Dr. Ivan Velasco, del Instituto de Fisiología Celular y Neurociencias de la UNAM. Quien se ha enfocado en la diferenciación neuronal a partir de iPSC.

A futuro se espera que este tipo de investigaciones ayude a pacientes con daño neuronal ya sea que puedan beneficiarse de las neuronas diferenciadas in vitro por medio de la repoblación neuronal del fenotipo afectado, por trasplante de neuronas o por conversión directa de célula gliales residentes. (Velasco, y otros, 2014). El Dr. Velasco ha participado activamente en investigaciones sobre las aplicaciones y potencial terapéutico de iPSC, tanto en la diferenciación neuronal (Velasco, y otros, 2014), como modelo para el

rescate genético del deterioro muscular (Romero Moya, y otros, 2017) incluso ha participado en asesoramientos de tesis de maestría sobre generación de iPSC (Arbesú Lago, 2016).

A pesar de contar con más de 20 años de haberse iniciado en nuestro país, la investigación en Células Troncales, es todavía un campo en crecimiento. En la actualidad, existen grupos en diversas instituciones (UNAM, IMSS, UAEM, CINVESTAV, INCAN, INR, INSP y otras) trabajando en esta línea de investigación. Por otra parte, el estudio con Células Troncales Pluripotenciales Inducidas es parcialmente nuevo, sin embargo, se ha generado un gran interés por parte de pacientes y autoridades correspondientes, lo que seguramente, acelerará su desarrollo (Pelayo, Santa Olalla, & Velasco, 2011).

Es necesario el conjunto de todos los organismos e instituciones activas en la investigación de células troncales, ya sea embrionarias e inducidas. Ya sean centros de investigación, organismos de bioética e Instancias legales, los cuales podrán proporcionar un desarrollo firme, confiable y prometedor en las aplicaciones clínicas de estas células. El objetivo principal es dar una atención personalizada, mayores opciones terapéuticas y mejor calidad de vida a miles de pacientes mexicanos.

Las células troncales pluripotenciales inducidas son un gran avance en la medicina, conllevan muchas ventajas que no presentan las células troncales embrionarias, principalmente no se atenta contra ningún principio bioético a la hora de la extracción de células para la reprogramación, ya que se obtiene directamente del paciente o donador, que con plena pleno uso de sus capacidades mentales, el y/o su familia pueden consultar y aprobar los permisos o regulación de dicha extracción. La cantidad de células troncales inducidas obtenidas el final de una reprogramación suele ser basto, teniendo en cuenta que de una pequeña muestra de células donadoras se pueden obtener varios cultivos celulares que pueden ser preservados para diferentes estudios o tratamientos. Al tener mayor cantidad de células troncales disponibles se pueden efectuar estudios en patologías donde la célula diana es muy difícil de obtener, tal es el caso de enfermedades neurodegenerativas y cardiovasculares.

Existen diferentes metodologías en la reprogramación celular, la primera reprogramación de iPSC se efectuó por medio de retrovirus, lo conllevaba un riesgo de la integración viral en el genoma del paciente, en la actualidad hay metodología por medio de RNA y proteínas que tiene una mayor seguridad clínica, y mayor eficiencia.

La investigación con este tipo de células sigue avanzando a pasos agigantados y esperamos que, en un futuro no muy lejano, pueda ser un tratamiento especializado para la población en general, sin riesgo de integración al genoma del paciente o rechazo de las células implantadas.

## Referencias

- Abou Saleh, H., Zouein, F. A., El Yazbi, A., Sanoudou, D., Raynaud, C., Rao, C., . . . Eid, A. H. (2018). The march of pluripotent stem cells in cardiovascular regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, 9(201).
- Ackermann, M., Kempf, H., Hetzel, M., Hesse, C., Hashtchin, A. R., Brinkert, K., . . . Lachmann, N. (2018). Bioreactor-based mass production of human iPSC-derived macrophages enables immunotherapies against bacterial airway infections. *Nature Communications*, 9(1), 1-13.
- Anokey, F., Trivedi, C., Juhr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., . . . Morrisey, E. (2011). Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 8(4), 376-388.
- Arbesú Lago, V. (2016). *Generación de Células Troncales Pluripotenciales Inducidas Humanas y su Diferenciación Neuronal*. CDMX, CU: UNAM.
- Asaka, A., & Shinya, Y. (2012). *Human Stem Cell Manual a Laboratory Guide* (Segunda ed.). (J. F. Loring, & S. E. Peterson, Edits.) San Diego, USA: Elsevier.
- Aznar, J., & Tudela, J. (2016). Diez años desde el descubrimiento de las células IPS: estado actual de su aplicación clínica. *Revista Clínica Española*, 217(1), 30-34.
- Ban, H., Nishishita, N., Fusaki, N., Tabata, T., Saeki, K., Shikamura, M., . . . Nishikawa, S. (2011). Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108(34), 14234-14239.
- Bardoni, M., Rey, F., Fantini, V., Pansarasa, O., Di Giulio, A. M., Carelli, S., & Cereda, C. (2018). From Neuronal Differentiation of iPSCs to 3D Neuro-Organoids: Modelling and Therapy of Neurodegenerative Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(12).
- Bersteyn, M., Nowakowski, T., Pollen, A., Lullo, E. D., Nene, A., Wynshw Boris, A., & Kriegstein, A. (2017). Human iPSC-Derived Cerebral Organoids Model Cellular Features of Lissencephaly and Reveal Prolonged Mitosis of Outer Radial Glia. *Cell Stem Cell*, 20, 435-449.
- Bian, S., Repic, M., Guo, Z., Kavirayani, A., Burkard, T., Bagley, J. A., . . . Knoblich, J. A. (2018). Genetically engineered cerebral organoids model brain tumor formation. *Nature Methods*, 15, 631-639.
- Brena Sesna, I. (2005). *Células troncales, aspectos jurídico-filosóficos*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Brena Sesna, I. (2015). Conflictos ideológicos en torno a la reglamentación de la investigación con células troncales embrionarias. *Gaceta Médica de México*(151), 273-277.
- Briggs, R., & King, T. J. (1952). Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frog's eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 38, 455-463.
- Bright, J., Hussain, S., Dang, V., Wright, S., Cooper, B., Byun, T., . . . Griswold Prenner, I. (2015). Human secreted tau increases amyloid-beta production. *Neurobiology of Aging*, 36, 693-709.
- Brind'Amour, K. (2018). Ethics and Induced Pluripotent Stem Cells. *The Embryo Project Encyclopedia*, 1-5. Obtenido de <https://embryo.asu.edu>

- Cassan, E. (2018). Urge expertos establecer regulación para tratamientos con células madre. México, México. Obtenido de <http://www.lja.mx/2018/04/urgen-expertos-establecer-regulacion-tratamientos-celulas-madre/>
- Castañeda Partida, M. L. (2004). Clonación. *Revista Digital Universitaria*, 5(2), 1-12.
- Cepero Noriega, F. L., Henández Hernández, B. A., & Carrero Texidor, C. Y. (2011). Aspectos bioéticos en los tratamientos con células. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 30(4), 528-536.
- Cho, H., Lee, C., Kwon, Y., Paek, J., Lee, S., Hur, J., . . . Kim, H. (2010). Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation. *Blood*, 116(3), 386-395.
- Chou, B. K., Mali, P., Huang, X., Ye, Z., Dowey, S., Resar, L., . . . Cheng, L. (2011). Efficient human iPS cell derivation by a non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures. *Science*, 21, 519-529.
- COFEPRIS. (2016). *Proyecto de Norma Oficial Mexicana NOM-260-SSA1-2015, para la disposición de células troncales y progenitoras con fines terapéuticos y de investigación.*
- Colman, A. (2013). Profile of John Gurdon and Shinya Yamanaka, 2012 Nobel Laureates in Medicine or Physiology. *PNAS*, 110(15), 5740-5741.
- Cortés, J. L., & García Pérez, J. L. (2011). Células Madre Embrionarias y Células Pluripotenciales Inducidas: ¿Pasado, presente y/o futuro de la medicina regenerativa? *Rev Asoc Est Biol*, 16(1), 55-61.
- Covarrubias, L. (2013). El Premio Nobel en fisiología o medicina 2012 reconoce a la reprogramación genómica como la base de la medicina regenerativa en el futuro. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 56(2), 55-59.
- Cowan, C. A., Klimanskaya, I., McMahon, J., Atienza, J., Witmyer, J., Zucker, J. P., . . . Melton, D. A. (2004). Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N. Engl. J. Med.*, 350, 1353-1356.
- Crespo, M., Vilar, E., Tsai, S., Chang, K., Amin, S., Srinivasan, T., . . . Chen, S. (2017). Colonic organoids derived from human induced pluripotent stem cells for modeling colorectal cancer and drug testing. *Nature Medicine*, 23, 878-884.
- Csobonyeiva, M., Polak, S., Koller, J., & Danisovic, L. (2015). Induced pluripotent stem cells and their implication for regenerative medicine. *Cell and Tissue Banking*, 16, 171-180.
- Czewinska, P., Mazerek, S., & Maciej, W. (2018). Applicaciton of induced pluripotency in cancer studies. *Reports of practical oncology and radiotherapy*, 23, 207-214.
- De la Rossa, A., Bellone, C., Golding, B., Vitali, I., Moss, J., Toni, N., . . . Jabaudon, D. (2013). In vivo reprogramming of circuit connectivity in postmitotic neocortical neurons. *Nat Neurosci*, 16(2), 193-200.
- Delgado Coello, B. A. (2011). ¿Qué es la epigenética? *Ciencia*, 62(1), 73-82.
- Drozd, A. M., Walczak, M. P., Piaskowski, S., Stoczynska-Fidelus, E., Rieske, P., & Grzela, D. P. (2015). Generation of human iPSCs from cells of fibroblastic and epithelial origin by means of the oriP/EBNA-1 episomal reprogramming system. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(122), 1-17.
- Dye, B., Hill, D., Ferguson, M., Tsai, Y., Nagy, M., Dyal, R., . . . Spence, J. (2015). In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *Elife*, 24(4).

- Ebert, A. D., Diecke, S., Chen, I. Y., & Wu, J. C. (2015). Reprogramming and transdifferentiation for cardiovascular development and regenerative medicine: where do we stand? *EMBO Molecular Medicine*, 7, 1090-1103.
- Elsade, T., Gurdon, J., & Fishberg, M. (1960). A description of the technique for nuclear transplantation in *Xenopus laevis*. *J. Embryol. exp. Morph.*, 8(4), 437-444.
- Espinasa Jaramillo, J., Cruz Loya, M., & Gonzalez Ichida, I. (2011). Memoria Epigenética de las Células Programadas. *REB*, 30(4), 159-160.
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-156.
- Fernandez, P. C., Frank, S. R., Wang, L., Schroeder, M., Lui, S., Greene, J., . . . Amati, B. (2003). Genomic targets of the human c-Myc protein. *Genes & Dev.*, 17, 1115-1129.
- Flores Figueroa, E., Montesinos, J. J., & Mayani, H. (2006). Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista de Investigación Clínica*, 58(5), 498-511.
- Fu, X. (2014). The immunogenicity of cells derived from induced pluripotent stem cells. *Cellular & Molecular Immunology*, 11, 14-16.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 85(8), 348-362.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *The Japan Academy*, 85(8), 348-362.
- Gabriel, E., Wason, A., Ramani, A., Gooi, L., Keller, P., Pozniakovsky, A., . . . Gopalakrishnan, J. (2016). CPAP promotes timely cilium disassembly to maintain neural progenitor pool. *EMBO J*, 35(3), 803-819.
- Gámez Escalona, J. A. (2013). La Investigación con Células Troncales Embrionarias, Ejemplo de Progreso Biotecnológico Bajo Presiones Extracientíficas. *Cuadernos de Bioética*, 24(3), 443-462.
- Gámez Escalona, J. A., & López Moratalla, N. (2014). Las células troncales pluripotenciales en la terapia celular. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 37(1), 129-136.
- Gao, P., Sun, C., Liao, W., Jiang, W., Liu, T., & Pan, W. (2017). Integrative Research of Induction of Pluripotent Stem Cells. *Integrative Medicine International*, 4, 115-124.
- Garcez, P., Loila, E., Madeiro da Costa, R., Higa, L., Trinde, P., Delvecchio, R., . . . Rehen, S. (2016). Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*, 352(6287), 816-818.
- Garrido Garrido, B., & Barcia González, M. (2011). El microscopio de Leeuwenhoek. *Eureka*, 8, 487-490.
- Gazarian, K. (2013). Células troncales pluripotenciales inducidas: herramienta para terapia celular y lucha contra el cáncer. *Ciencia*, 64(2), 66-72.

- Gonzalez Espinoza, C. R. (2013). Células madre, aspectos éticos y jurídicos II. *Revista Jurídica "Docentia et Investigatio"*, 15(2), 75-85.
- González Vidal, E., García Linares, G., Leyva Divú, A., & Rosquete López, G. (2007). Clonación humana, enfoque didáctico, científico y Bioético. *Archivo Médico de Camagüey*, 11(1), 1-7.
- Gonzalez, F., Barragan Monasterio, M., Tiscornia, G., Montserrat Pulido, N., Vassena, R., Batlle Morena, L., . . . Izpisua Belmonte, J. (2009). Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci USA*, 106(22), 8918-8922.
- Grande, A., Sumiyoshi, K., López Juárez, A., Howard, J., Sakthivel, B., Aronow, B., . . . Nakafuku, M. (2013). Environmental Impact on Direct Neuronal Reprogramming In Vivo in the Adult Brain. *Nat Commun*, 4(2373).
- Grant Rowe, R., & Daley, G. Q. (2019). Induced pluripotent stem cells in. *Nature Reviews Genetics*, 1-12.
- Guerrero Mothelet, V. (2004). Células troncales: la controversia. *¿Cómo ves?*, 62, 10-14.
- Guo, Z., Zhang, L., Wu, Z., Chen, Y., Wang, F., & Chen, G. (2014). In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell*, 14(2), 188-202.
- Gurdon, J. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 10(4), 622-640.
- Gurdon, J. (1960). The effects of ultraviolet irradiation on uncleaved eggs of *Xenopus laevis*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 101(3), 299-311.
- Gurdon, J. (2013). The cloning of a frog. *The Company of Biologists Ltd*, 140(12), 2446-2448.
- Hou, P., Li, Y., Zhang, X., Liu, C., Guan, J., Li, H., . . . Deng, H. (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science*, 341(6146), 651-654.
- Hung, S. S., Khan, S., Lo, C. Y., Hewitt, A. W., & Wong, R. C. (2017). Drug discovery using induced pluripotent stem cell models of neurodegenerative and ocular diseases. *Pharmacology & Therapeutics*(177), 32-43.
- J., Y., MA, V., Otto, S., Bourget J, A., JL, F., S., T., . . . Thomson, J. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917-1920.
- Jacob, A., Morley, M., Hawkins, F., McCauley, K., Jean, J., & Heins, H. (2017). Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells into Functional Lung Alveolar Epithelial Cells. *Cell Stem Cell*, 21, 472-488.
- Jiang, Z., Han, Y., & Cao, X. (2014). Induced pluripotent stem cell (iPSCs) and their application immunotherapy. *Cellular & Molecular Immunology*, 11(1), 17-24.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., & Woktjen, K. (2009). Virus free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 458(7239), 771-775.
- Khan, M., Narayanan, K., Lu, H., Choo, Y., Du, C., Wiradharma, N., . . . Wan, A. (2013). Delivery of reprogramming factors into fibroblasts for generation of non-genetic induced pluripotent stem cells using a cationic bolaamphiphile as a non-viral vector. *Biomaterials*, 34(21), 5336-5343.



- Kim, D., Kim, C., Moon, J., Chung, Y., Chang, M., Han, B., . . . Kim, K. (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell*, 4(6), 472-476.
- Kondo, Y., Toyoda, T., Inagaki, N., & Osafune, K. (2018). iPSC technology-based regenerative therapy for diabetes. *Journal of Diabetes Investigation*, 9(2), 234-243.
- Koyanagi-Aoi, M., Ohnuki, M., Takahashi, K., Okita, K., Noma, H., Sawamura, Y., . . . Yamanaka, S. (2013). Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110.
- Kruif, P. (2018). *Cazadores de microbios*. México, México: Mirlo Pocket.
- Kunisada, Y., Tsubooka Yamazoe, N., Shoji, M., & Hosoya, M. (2012). Small molecules induce efficient differentiation into insulin-producing cells from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res*, 8(2), 274-284.
- Liang, G., & Zhang, Y. (2013). Embryonic stem cell and induced pluripotent stem cell: an epigenetic perspective. *Cell Research*, 23(1), 49-69.
- Lin, S., Chang, D., Lin, C., Ying, S., Leu, D., & Wu, D. (2011). Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression. *Nucleic Acids Res*, 39(3), 1054-1065.
- Lin, T., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H. L., Yoder, M. C., & Chang, R. J. (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood*, 105, 635-637.
- M Schleager, T., Daheron, L., R Brickler, T., Entwisle, S., Chan, K., Cianci, A., . . . Gupta, D. (2015). A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nature Biotechnology*, 33(1), 58-66.
- Macarthur, C., Fontes, A., Ravinder, N., Kuninger, D., Kaur, J., Bailey, M., . . . Lieu, P. (2012). Generation of human-induced pluripotent stem cells by a nonintegrating RNA Sendai virus vector in feeder-free or xeno-free conditions. *Stem Cells Int*, 564612.
- Mack, A. A., Kroboth, S., Rajesh, D., & Wang, W. B. (2011). Generation of induced pluripotent stem cells from CD34+ cells across blood drawn from multiple donors with non-integrating episomal vectors. *PLoS One*, e27956.
- Manzar, G. S., Kim, E. M., & Zavazana, N. (2017). Demethylation of induced pluripotent stem cells from type 1 diabetic patients enhances differentiation into functional pancreatic  $\beta$  cells. *J Biol Chem*, 292(34), 14066-14079.
- Mariani, J., Coppola, G., Zhang, P., Abyzov, A., Provini, L., Tomasini, L., . . . Vaccarino, F. M. (2015). FOXG1-Dependent Dysregulation of GABA/Glutamate Neuron Differentiation in Autism Spectrum Disorders. *Cell*, 162(2), 375-390.
- Masson, C., & Dunnill, P. (2008). A brief definition of regenerative medicine. *Future Medicine*, 3(1), 1-5.
- Mata Miranda, M., Vázquez Zapien, G. J., & Sánchez Monroy, V. (Mayo de 2013). Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatología y Reproducción Humana*, 27(3), 194-199.
- Matveyenko, A., & Vella, A. (2015). Regenerative Medicine in Diabetes. *Mayo Clin Proc*, 90(4), 546-554.
- McMahon, A. P., & Bradley, A. (1990). The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*, 72, 1073-1085.

- McNeish, J., Gardner, J. P., Wainger, B. J., Woolf, C. J., & Eggan, K. (2015). From Dish to Bedside: Lessons Learned While Translating Findings from a Stem Cell Model of Disease to a Clinical Trial. *Cell Stem Cell*, 17, 8-10.
- Merchant Larios, H., & Tapia Ibarguengoytia, R. (30 de Enero de 2018). *La clonación Humana, aún lejos de ser una realidad: académicos de la UNAM*. UNAM. México: Boletín. Recuperado el 18 de Julio de 2018, de [http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2018\\_055.html](http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2018_055.html)
- Millman, J., Xie, C., Van Dervort, A., Gutler, M., Pagliuca, F., & Melton, D. (2016). Generation of stem cell-derived  $\beta$ -cells from patients with type 1 diabetes. *Nat Commun*, 7, 11463.
- Minagawa, A., & Kaneko, S. (2014). Rise of iPSCs as a cell source for adoptive immunotherapy. *Human Cell*, 27, 47-50.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., . . . Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, 113, 631-642.
- Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, D., Nishikawa, S., . . . Mori, M. (2011). Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAa. *cell Stem Cell*, 8(6), 633-638.
- Montserrat, N., Garreta E, González, F., Gutiérrez, J., Eguizábal, C., Ramos, V., . . . Izpisua Belmonte, J. (2011). Simple generation of human induced pluripotent stem cells using poly-beta-amino esters as the non-viral gene delivery system. *J Biol Chem*, 286(14), 12417-12428.
- Morizane, A., Doi, D., Kikuchi, T., Okita, K., Hotta, A., Kawasaki, T., . . . Takahashi, J. (2013). Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cell in the brain of a non-human primate. *Stem Cell Reports*, 1(4), 283-292.
- Murata, M., Tohyama, S., & Fukuda, K. (2010). Impacts of recent advances in cardiovascular regenerative medicine in clinical therapies and drug discovery. *Pharmacology & Therapeutics*, 126, 109-118.
- Naryshkin, N. A., Weetall, M., Dakka, A., Narasimhan, J., Zhao, X., Zhihua, F., & Ling, K. (2014). SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. *Science*, 345, 688-693.
- Nishino, K., Arai, Y., Takasawa, K., Toyoda, M., Yamazaki Inoue, M., Sugawara, T., . . . Umezawa, A. (2010). Epigenetic-scale comparison of human iPSCs generated by retrovirus, Sendai virus or episomal vectors. *JSRM*, 9, 71-78.
- NobelPrize.org. (2012). *The Nobel Prize*. Recuperado el 13 de Noviembre de 2018, de <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2012/press-release/>
- Ogawa, M., Ogawa, S., Bear, C. E., Ahmadi, S., Chin, S., Li, B., . . . Ghanekar, A. (2015). Directed differentiation of cholangiocytes from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, 33(8), 853-861.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*, 322(5903), 949-953.
- Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., . . . Yamanaka, S. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Methods*, 8(5), 409-414.
- Okita, K., Yamanawa, T., Matsumura, Y., Sato, Y., Amano, N., Watanabe, A., . . . Yamanaka, S. (2013). An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells*, 31(3), 458-466.

- OMS. (2018). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/about\\_cvd/es/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/about_cvd/es/)
- Pagliuca, F., Millman, J., Gutler, M., Segel, M., Van Dervort, A., Ryu, J., . . . Melton, D. (2014). Generation of functional human pancreatic  $\beta$  cells in vitro. *Cell*, *159*(2), 428-439.
- Pelayo, R., Santa Olalla, J., & Velasco, I. (2011). *Células Troncales y Medicina Regenerativa*. México: Ediciones Buena Onda S.A. de C.V.
- Pessach, I. M., Ordovas Montanes, J., Zhang, S. Y., Casanova, J. L., Giliani, S., Gennery, A. R., . . . Notarangelo, L. D. (2011). Induced pluripotent stem cells: A novel frontier in the study of human primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol*, *127*(6), 1400-1407.
- Plews, J., Li, J., Jones, M., Moore, H., Mason, C., Andrewa, P., & Na, J. (2010). Activation of pluripotency genes in human fibroblast cells by a novel mRNA based approach. *PLoS One*, *5*(12), e14397.
- Poulos, J. (2018). The limited application of stem cells in medicine: a review. *Stem Cell Research & Therapy*, *9*(1), 1-11.
- Qian, X., Nguyen, H., Song, M., Hadiono, C., Ogden, S., & Hammack, C. (2016). Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell*, *165*(5), 1238-1254.
- Ramalho Santos, M., & Willenbring, H. (July de 2007). On the Origin of the Term “Stem Cell”. *Cell stem cell*, *1*(1), 35-38.
- Revilla, A., González, C., Iriondo, A., Fernández, B., Prieto, C., Marín, C., & Liste, I. (March de 2015). Current advances in the generation of human iPS cells: implications in cell-based regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med*, 1-16.
- Rezania, A., Bruin, J., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., . . . Kieffer, T. (2014). Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, *32*(11), 1121-1133.
- Romero Moya, D., Santos Ocana, C., Castano, J., Garrabou, G., Rodríguez Gomez, J., Ruiz Bonilla, V., . . . Menendez, P. (2017). Genetic Rescue of Mitochondrial and Skeletal Muscle Impairment in an Induced Pluripotent Stem Cells Model of Coenzyme Q(10) Deficiency. *Stem Cells*, *35*(7), 1687-1703.
- Rouaux, C., & Arlotta, P. (2013). Direct lineage reprogramming of post-mitotic callosal neurons into corticofugal neurons in vivo. *Nat Cell Biol*, *15*(2), 214-221.
- Rowland, B. D., Bernards, R., & Peeper, D. S. (2005). The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Cell Biol.*, *7*, 1074-1082.
- Sampaziotis, F., Cardoso de Brito, M., Madrigal, P., Bertero, A., Saeb-Parsy, K., Soares, F., . . . Vallier, L. (2015). Cholangiocytes derived from human induced pluripotent stem cells for disease modeling and drug validation. *Nature Biotechnology*, *33*, 845-852.
- Sánchez, A. (16 de Junio de 2017). *Cambia la religiosidad en México*. Obtenido de El Universal: <http://www.eluniversal.com.mx/articulo/nacion/sociedad/2017/06/16/cambia-la-religiosidad-en-mexico-encuesta>
- Schlaeger, T. M., Daheron, L., Brickler, T. R., Entwisle, S., Chan, K., Cianci, A., . . . Ettenger, A. (2015). A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nature Biotechnology*, *33*(1), 58-65.
- Scientific, T. F. (2018). *Thermo Fisher Scientific*. Obtenido de <https://www.thermofisher.com/mx/es/home/life-science/cell-culture/transfection/selection/g418.html>

- Seki, T., Yuasa, S., & Fukuda, K. (2010). Generation of induced pluripotent stem cells from a small amount of human peripheral blood using a combination of activated T cells and Sendai virus. *Nat Protoc*, *7*(4), 718-728.
- Shahjalal, H. M., Abdal Dayem, A., Lin, K. M., Jeon, T. I., & Cho, S. G. (2018). Generation of pancreatic  $\beta$  cells for treatment of diabetes: advances and challenges. *Stem Cell Research & Therapy*, *9*(1), 355.
- Shi, Y., Haruhisa, I., C. Wu., J., & Yamanaka, S. (2017). Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov*, *16*(2), 115-130.
- Si Tayeb, K., Noto, F. K., Sepac, A., Sedic, F., Bosnjak, Z. J., Lough, J. W., & Duncan, S. (2010). Generation of human induced pluripotent stem cells by simple transient transfection of plasmid DNA encoding reprogramming factors. *BMC Dev Biol*, *10*(81), 1-10.
- Singh, V. K., Kalsan, M., Kumar, N., Saini, A., & Chandra, R. (2 de Febrero de 2015). Induced pluripotent stem cell: applications in regenerative medicine, disease modeling, and drug discovery. *Frontiers in cell and developmental biology*, *3*(2), 1-18.
- Smith, D. K., He, M., Zhang, C. L., & Zheng, J. C. (2017). The therapeutic potential of cell identity reprogramming for the treatment of aging-related neurodegenerative disorders. *Progress in Neurobiology*, *157*, 212-229.
- T. Arita, H. (2003). Los animalucos de Leeuwenhoek. *Ciencias*, *71*, 66-68.
- Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., & Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Current Biology*, *11*(19), 1553-1558.
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*, 663-676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, *131*, 861-872.
- Takasato, M., Er, P., Chiu, H., Maier, B., Baillie, G., Ferguson, C., . . . Little, M. (2015). Kidney organoids from human iPS cells contain multiple lineages and model human nephrogenesis. *Nature*, *526*, 564-568.
- Takashi, A. (2016). 10th Anniversary of iPS cells: the challenges that lie ahead. *J. Biochem*, *160*(3), 121-129.
- Thomson, J., Itskovitz-Eldor, J., Waknitz, M. A., Shapiro, S. S., Swiergiel, J. J., Marshall, V. J., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocyst. *Science*, *282*, 1145-1147.
- Todovora, D., Kim, J., Hamzeinejad, S., He, J., & Xu, Y. (2016). Brief Report: Immune Microenvironment Determines the Immunogenicity of Induced Pluripotent Stem Cell Derivatives. *Stem Cells*, *34*(2), 510-515.
- Torper, O., Pfisterer, U., Wolf, D. A., Pereira, M., Lau, S., Jakobsson, J., . . . Parmar, M. (2013). Generation of induced neurons via direct conversion in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, *110*(17), 7038-7043.
- Toyoda, T., Mae, S., Tanaka, H., Kondo, Y., Funato, M., Hosokawa, Y., . . . Osafune, K. (2015). Cell aggregation optimizes the differentiation of human ESCs and iPSCs into pancreatic bud-like progenitor cells. *Stem Cell Res*, *14*(2), 185-197.

- Trevisan, M., Desole, G., Costanzi, G., Lavezzo, E., Palù, G., & Barzon, L. (2017). Reprogramming Methods Do Not Affect Gene Expression Profile of Human Induced Pluripotent Stem Cell. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(206), 1-14.
- Tucker, B., Solivan-Timpe, F., Roos, B., Anfinson, K., Robin, A., Wiley, L., . . . Fingert, J. (2014). Duplication of TBK1 Stimulates Autophagy in iPSC-derived Retinal Cells from a Patient with Normal Tension Glaucoma. *J Stem Cell Res Ther*, *3*(161).
- U., B. D., & Benvenisty, N. (April de 2011). The tumorigenicity of human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Nat Rev Cancer*, *11*(4), 268–277.
- Velasco, I., & Lopez Gonzalez, R. (2012). Therapeutic Potential of Motor Neurons Differentiated from Embryonic Stem Cells and Induced Pluripotent Stem Cells. *Arch Med Res*, *43*(1), 1-10.
- Velasco, I., Salazar, P., Giorgetti, A., Ramon Mejia, V., Castano, J., Romero Moya, D., & Menendez, P. (2014). Concise Review: Generation of Neurons From Somatic Cells of Healthy Individuals and Neurological Patients Through Induced Pluripotency or Direct Conversion. *Stem Cell*, *32*, 2811–2817.
- Velasco, I., Salazar, P., Giorgetti, A., Ramos Mejia, V., Castano, J., Romero Moya, D., & Menendez, P. (2014). Concise Review: Generation of Neurons From Somatic Cells of Healthy Individuals and Neurological Patients Through Induced Pluripotency or Direct Conversion. *Stem Cells*, *32*(11), 2811-2817.
- Voges, H. K., Mills, R. J., Elliott, D. A., Parton, R. G., Porrello, E. R., & Hudson, J. E. (2017). Development of a human cardiac organoid injury model reveals innate regenerative potential. *Development*, *144*, 1118-1127.
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., . . . Rossi, D. J. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells using synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, *5*(7), 618–630.
- Warren, L., Manos, P., Ahfeldt, T., Loh, Y., Li, H., Lau, F., . . . Rossi, D. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, *7*(5), 618-630.
- Workman, M. J., Mahe, M. M., Trisno, S., Poling, H., Watson, C., Sundaram, N., . . . Wells, J. M. (2017). Engineered human pluripotent-stem-cell-derived intestinal tissues with a functional enteric nervous system. *Nature Medicine*, *23*, 49-59.
- Xin, L., Wenjuan, L., Xuemel, F., & Yang, X. (2017). The Immunogenicity and Immune Tolerance of Pluripotent Stem Cell Derivatives. *Frontiers in Immunology*, 1-6.
- Yabe, S. G., Fukuda, S., Takeda, F., Nashiro, K., Shimoda, M., & Okochi, H. (2017). Efficient generation of functional pancreatic  $\beta$ -cells from human induced pluripotent stem cells. *J Diabetes*, *9*(2), 198-179.
- Yoshioka, N., Gros, E., Li, H. R., Kumar, S., Deacon, D. C., Maron, C., . . . Dowdy, S. F. (2013). Efficient Generation of Human iPS Cells by a Synthetic Self-Replicative RNA. *Cell Stem Cell*, *13*(2), 1-21.
- Yu, J., Hu, K., Smuga Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I., & Thomson, J. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*, *324*(5928), 797-801.
- Yu, J., Hu, K., Smuga, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2009). Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science*, *324*(5928), 797-801.

- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2009). Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science*, 324(5928), 797–801.
- Yu, J., Vodyanik, M., Smuga Otto, K., Antosiewicz Bouget, J., Frane, J., Tian, S., . . . Thomson, J. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318(5858), 1917-1920.
- Zakrzewski, W., Dobrzynski, M., Szymonowicz, M., & Rybak, Z. (2019). Stem cells: past, present, and future. *Stem Cell Research & Therapy*, 10(1), 1-23.
- Zhang, D., Jiang, W., Liu, M., Sui, X., Yin, X., Chen, S., . . . Deng, H. (2009). Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res*, 19(4), 429-438.
- Zhen, L., Yijun, C., Yan, W., Yanhong, N., Chenchen, Z., Yuting, X., . . . Qiang, S. (2018). Cloning of macaque monkeys by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 174(1), 174-245.
- Zhengping, J., Yanmei, H., & Xuetao, C. (2014). Induced pluripotent stem cell (iPSCs) and their application in immunotherapy. *Cellular and Molecular Immunology*, 11, 17-24.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J., Zhu, S., Han, D., Lin, T., . . . Ding, S. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 4(5), 381-384.
- Zhou, W., & Freed, C. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 27(11), 2267-2274.