

IN LIBERTATEM VOCATI



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO

**LAUDATIO DEL PROF. DR. PEDRO GUILLÉN GARCÍA
EN LA INVESTIDURA COMO DOCTOR HONORIS
CAUSA DEL PROFESOR EMÉRITO**

**D. JUAN CARLOS IZPISUA BELMONTE
Y D. RENÉ VERDONK**

Templo del Monasterio de Los Jerónimos
Murcia, 13 de junio de 2014

Excelentísimo Presidente de la Universidad Católica San Antonio de
Murcia,

Su Eminencia Reverendísima Cardenal Antonio Cañizares Llovera,
Prefecto de la Congregación para el Culto Divino y la Disciplina de
los Sacramentos

Excelentísima y Magnífica Rectora de esta Universidad,

Excelentísimo y Reverendísimo Señor Obispo de la Diócesis de
Cartagena,

Excelentísimas e Ilustrísimas Autoridades Académicas, Eclesiásticas,
Civiles y Militares.

Claustro de profesores, personal de administración y servicios,
alumnos e invitados a este solemne acto académico.

Para la UCAM hoy es un día grande y gozoso, y además especialmente festivo, ya que con sus mejores galas recibe como Doctores Honoris Causa a dos eminentes investigadores: D. Juan Carlos Izpisua Belmonte y D. René Verdonk, español y belga respectivamente. Nuestro Presidente, el Excmo. Sr. D. José Luis Mendoza y nuestra Magnífica Rectora, Dña. Josefina García, primero aceptaron la candidatura que desde la Cátedra de Traumatología del Deporte hicimos, y segundo por la deferencia de invitarme para que haga su Laudatio.

Ahora me atañe, en unos minutos, trazarles a ustedes la vida profesional de los Doctores Honoris Causa.

No es una tarea vana, ni es una simple revisión de un catálogo de anécdotas, estudiar y exponer la vida de los grandes hombres, es sencillamente descubrir los perfiles de la inmortalidad.

Gracias Presidente y Rectora.

A continuación, realizaré una breve reseña de la vida profesional de D. Juan Carlos Izpisua Belmonte y de D. René Verdonk.

LAUDATIO DEL PROFESOR DR. PEDRO GUILLÉN GARCÍA EN LA INVESTIDURA COMO DOCTOR HONORIS CAUSA DEL PROFESOR EMÉRITO

D. RENÉ VERDONK

Querido Prof. René Verdonk, es un gran honor para mí hacer el Laudatio de tu Investidura como Doctor Honoris Causa de la Universidad Católica de San Antonio de Murcia.

DOCTOR HONORIS CAUSA es la expresión latina que significa “por su méritos”, es el título de máximo prestigio en una Universidad y se concede a modo Honorífico, en reconocimiento a los méritos personales y profesionales.

Nació en Gante (Bélgica), en 1946, cuando Europa ardía en llamas, y se licenció en Medicina en la Universidad de Gante en 1971, y obtuvo la especialidad en Cirugía Ortopédica y Traumatología en 1976. Su Tesis, en 1992, en la Universidad de Gante, sobre “Viabilidad del injerto meniscal” en la que obtiene su máxima calificación, ya nos anuncia lo que será su tema estrella en su profesión: el injerto y el trasplante meniscal, parcela en la que es su máxima autoridad mundial.

Vida Universitaria:

En la Universidad de Gante, su ciudad natal, ha ejercido siempre la especialidad de Cirugía Ortopédica y Traumatología y en el Ghent University Hospital ha vivido su brillante carrera hasta llegar a Jefe del Departamento de Ortopedia y Traumatología. También en la Universidad de Gante, en 1992, alcanzó el cargo de Profesor de Cirugía Ortopédica y Traumatología y en octubre de 2011 ha sido nombrado Profesor Emérito.

Es en sus actividades profesionales donde destaca como una de las figuras más sobresalientes de la Cirugía Ortopédica Internacional, destacando como

cirujano excepcional con múltiples intervenciones quirúrgicas y descripción de nuevas técnicas operatorias. Realizó los primeros trasplantes meniscales de rodilla. Su técnica es seguida por todos los cirujanos ortopédicos, sus conocimientos le han permitido ser invitado a innumerables congresos internacionales y sus publicaciones son consultadas por los estudiosos del tema.

Su labor investigadora es extensísima, destacando en el trasplante meniscal. Basta leer su amplia lista de publicaciones que adjuntamos para entender que se trata de un Grande de la Cirugía Ortopédica y Traumatología.

Enumeramos algunas de sus *Actividades Clínicas, Educativas y Tesis*.

Publicaciones a1

1. Interobserver reliability of the International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine (ISAKOS) classification of meniscal tears Anderson AF, Irrgang DJ, Dunn W, Beaufils P, Cohen M, Cole BJ, Coolican M, Ferretti M, Glenn RE Jr, Johnson R, Neyret P, Ochi M, Panerella L, Siebold R, Spindler KP, Ait Si Selmi T, Verdonk P, Verdonk R, Yasuda K, Kowalchuk DA Am J Spo Med, 2011, Mar 16, Epub ahead of print
2. Twenty-six years of meniscal allograft transplantation: is it still experimental ? A meta-analysis of 44 trials.
Elattar M, Dhollander A, Verdonk R, Almqvist KF, Verdonk P
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2011, 19, 147-157
3. Tissue ingrowth after implantation of a novel, biodegradable polyurethane scaffold for the treatment of partial meniscus lesions
Verdonk R, Verdonk P, Huysse W, Forsyth R, Heinrichs EL
Am J Sports Med, 2011, Mar 7 (Epub ahead of print)
4. Injury vol 44 suppl 1 jan 2013 ISSN 0020 1383
Indications and limits of Meniscal Allograft Transplantation
R Verdonk P Volpi P Verdonk H Vander Bracht M van Laer K F
Almqvist S Van der Eecken E Propsero A Quaglia

Publicaciones a2

1. Repair of symptomatic cartilage lesions of the knee. The place of autologous chondrocyte implantation.
Vanlauwe J., Almqvist F., Bellemans J., Huskin J.P., Verdonk R., Victor J.
Acta Orthop. Belg., 2007, 73:145-158.
2. La transplantation méniscale.
Verdonk R., Verdonk P., Almqvist F.
e-Mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie, 2007, vol. 6, n° 3, 010-014.
3. Meniscus replacement: from allograft to tissue engineering.
Verdonk P.C.M., Van Laer M.E.E., Verdonk R.
Sportorthopädie-Sporttraumatologie, 2008, 24:78-82.

Publicaciones a3

1. Syndesmosis tibiofibularis pathologie.
G. Van Esbroeck, P. Burssens, R. Verdonk.
Vlaams T. Sportgeneeskunde en Sportwetenschappen, 1995, 64, 35-41.
2. Alternatieve behandelingswijzen voor meniscusletsels.
R. Verdonk
Vlaams T. Sportgeneeskunde en Sportwetenschappen, 1998, 77, 22-27.
3. Meniscustransplantatie.
R. Verdonk
Vlaams T. Sportgeneeskunde en Sportwetenschappen, 2001, 87, 13-18.

Publicaciones a4

1. Bio-artificiële implantatie in de orthopedie.
Verdonk R., Almqvist K.F., Verdonk P., Verstraete K.
Verhandelingen van de Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België, 2004, 66: 269-274.

2. Bilateral traumatic simultaneous rupture of the medial collateral and anterior cruciate ligaments – A case report.

A. Schepens, J. Van Nuffel, E. Audenaert, R. Verdonk.

In: Folia Traumatologica Belgica 2005, Reynders P., De Baere T., Delloye C., Verdonk R., Broos P., Fabry G. (eds), 2005, 45-50.

3. Kraakbeen en meniscus, een intieme balans.

Verdonk R., Beaufils P., Almqvist F., Verdonk P.

Ortho Rheumato, 2007, 5:6-8.

Autor, Coautor b1

Viabile meniscal allografts.

R. Verdonk.

Thesis, Universiteit Gent, 1992.

Capítulos en libros b2

1. Meniscal Disorders

René Verdonk, Karl. F. Almqvist and Peter Verdonk

In: Orthopedic Sports Medicine: Principles and Practice, Fabrizio

Margheritini, Roberto Rossi (eds), Springer, 2010, 397- 416.

ISBN 978-88-470-1701-6

2. Meniscal healing enhancement techniques

Petronilia S., Verdonk R., Almqvist F., Verdonk P.

In : Meniscus repair, Beaufils P., Boisrenoult P., Pujol N. eds, Roma,

CIC Edizioni Internazionali 2011, 25-29

ISBN 978-88-7141-914-5

3. Long term outcomes of combines anterior cruciate ligament and allograft meniscus transplantation

In : Lesiones ligamentosas de la Rodilla

J A Hernandez Hermoso

J C Monllau Garcia , eds

Marge med books Valencia Spain

ISBN 978 84 1530 26 3

Conferencias c3

1. The biology of meniscal repair

P. Verdonk, R. Verdonk.

The 26th International Jerusalem Symposium on Sports Medicine, Jerusalem (Israel), 20-21 January 2010, Abstract book p. 26.

2. Long-term results of ACL repair and allografts

F. Almqvist, S. De Brabandere, P. Willaert, R. Verdonk

The 26th International Jerusalem Symposium on Sports Medicine, Jerusalem (Israel), 20-21 January 2010, Abstract book p. 53.

3. A novel meniscus scaffold for the treatment of meniscal tear or meniscal loss.

Verdonk P, Huysse W, Verstraete K, Verdonk R

International Bone-Tissue-Engineering Congress, Hamburg

(Germany), 07-09 November 2008. Tissue Engineering Part A, May 2009, 15:024-024.

Monografía

Current opinion of orthopaedic surgeons on cartilage repair: the results of a global web-based survey.

R. Verdonk, M. Steinwachs, J. Vanlauwe, L. Engebretsen.

Trends in Cartilage Repair, September 2006.

Como pueden comprobar su Currículum Vitae está repleto de méritos para merecer la gran distinción de Doctor Honoris Causa de la UCAM.

El Prof. René Verdonk ha realizado una actividad asistencial a lo grande y ha puesto en marcha el trasplante meniscal. Siempre ha ejercido su actividad profesional en su ciudad natal, Gante, y ha buscado otro camino a la meniscectomía para evitar la artrosis secundaria; “y es que probar todo puede tener censura pero saberlo todo no tiene censura”.

La Cirugía Ortopédica, desde la osteosíntesis, prótesis, artroscopia y cultivos celulares, estaba necesitada de golpes de “buena suerte” pero éstos son sólo para los que lo buscan y lo trabajan. En investigación la fortuna o suerte se muestra al estudioso, o mejor, a la mente preparada; ya aparece aquí la intuición, un ejemplo excelente de algo que no es aprendido, el acto instintivo, pero que sigue unido –dependiendo– al aprendizaje.

He visto, Excelentísimas Autoridades que nos presiden, a los investidos hoy “Doctores Honoris Causa” de la UCAM agradablemente sorprendidos por este hermoso, colorido, ordenado y espectacular acto, y es que las mentes brillantes, como ellos, han de hallarse preparadas para ser sorprendidas.

Enhorabuena, Prof. René Verdonk, y ahora a desarrollar tu tema meniscal:

Meniscal Repair and Replacement: Where do we stand?
Reparación Meniscal y Sustitución: ¿Dónde estamos?

LAUDATIO DEL PROFESOR DR. PEDRO GUILLÉN GARCÍA EN LA INVESTIDURA COMO DOCTOR HONORIS CAUSA DEL PROFESOR INVESTIGADOR

D. JUAN CARLOS IZPISUA BELMONTE

Me siento muy honrado por haber sido elegido siguiendo las normas de la Universidad (UCAM) para ostentar la representación de esta muy Docta Institución y realizar el Laudatio en este solemne Acto de recepción pública de Doctor Honoris Causa del Profesor Investigador Juan Carlos Izpisua Belmonte.

Como es costumbre y norma, primero trazamos algunos aspectos de su biografía y después comentaremos sus méritos curriculares y acabaremos dándole el abrazo de bienvenida al Claustro de Doctores de nuestra Universidad.

La vida del Profesor Investigador D. Juan Carlos Izpisua Belmonte, nacido en Hellín (Albacete), ha sido dura pero con un gran tesón y voluntad indomable de superarse.

Casado y con dos hijos, Luna y Elías. Estas tres personas son lo más importante de su vida.

Me niego a realizar ninguna semblanza de D. Juan Carlos Izpisua Belmonte, ya que al leer el siguiente relato, que de su vida desde niño hasta universitario pasando por la adolescencia comentamos, entenderemos enseguida la gran personalidad y enorme talento que siempre le ha distinguido.

El padre de Juan Carlos se fue de casa cuando él tenía tres años y ya tenía dos hermanos menores de 2 y 1 años. Estuvo 2 ó 3 años en un colegio en Hellín pero la madre sin medios se puso a trabajar y para ello puso a los tres hermanos en un colegio interno que se llamaba Hogar Castillo de Olite, que está en Murcia, y allí estudió 3-4 años.

En las vacaciones escolares la madre los llevaba con ella a la recogida de almendras, a vender turrón por las ferias de los pueblos, y cuando cumplió Juan Carlos diez años la madre lo sacó del colegio para que se fuera con ella a Benidorm a trabajar.

Trabajó en varios bares de camarero y en uno de ellos, un bar alemán, tocaba también la guitarra y preparaba sangrías (las mejores sangrías de Benidorm según Juan Carlos). Próximo al bar había un hotel donde empezó a trabajar de botones y allí pasó varios años y es donde su vida da un verdadero cambio. Ya tiene catorce años, lee todo lo que cae en sus manos, y todos los compañeros se dan cuenta de su gran inteligencia. Es cuando el director del hotel le anima a que se saque el graduado escolar. Aprueba el examen y se matricula en el instituto de Altea para hacer B.U.P. en el turno de noches para poder trabajar por el día en la recepción.

El hotel lo cierran un año y se pasa al turno de día. Entonces decide que lo que quiere es estudiar. Aquí empieza su carrera y ya no ha parado de correr.

Se mueve mucho para conseguir becas que le financien los estudios e intenta siempre ser el mejor para conseguir las más importantes becas.

Dudó qué carrera hacer y decide matricularse en Medicina pero la Facultad está cerrada el día que él va a Valencia, y la Facultad de Farmacia (pegada a la de Medicina) está abierta y allí se matricula.

Lo de menos es dónde se matriculó, ya que su energía y ganas de hacer algo en la vida le hubiera llevado al éxito en cualquier otra carrera ¡Le sobra talento y ganas de trabajar! Fue Premio Extraordinario de su promoción. Consiguió una beca –otra más de las muchas que disfrutó– para hacer el Doctorado en dos años en el Colegio de los Españoles de Bolonia (Italia) y de allí se fue a Heidelberg (Alemania) para realizar un trabajo postdoctoral.

Gran aficionado al fútbol, todos los años que vivió en Benidorm jugó de defensa en el equipo (Benidorm) y lo ficharon al verle jugar en la calle. Jugó también un tiempo en el Hércules de Alicante pero al final se decidió por los

estudios. Si no se hubiera dedicado a estudiar hoy sería un magnífico entrenador de la primera división por sus grandes dotes para dirigir un equipo.

D. Juan Carlos Izpisua Belmonte ha conseguido grandes logros en la labor investigadora y en este sentido es una vida plena de tareas bien realizadas, y quiero manifestar mi alegría y satisfacción y dejar pública constancia y certeza de ello.

Desde joven estudiante de Farmacia en la Universidad de Valencia mostró una gran vocación, amante incondicional de la innovación, lo que le ha llevado a saltar no sólo servicios de investigación, sino países y continentes (España, Italia, Alemania, Reino Unido Y EE.UU.).

Tras obtener en 1987 el Doctorado por la Universidad de Valencia (España) y de la Universidad de Bolonia (Italia), hace una estancia post doctoral en las Universidades de Cambridge y Oxford (Inglaterra), y después otra estancia investigadora de Juan Carlos Izpisua Belmonte en Heidelberg (Alemania). A continuación, cruza el atlántico a trabajar en UCLA, Los Ángeles (USA), y en 1993 es contratado por el Salk Institute for Biological Studies en la Jolla, California, y actualmente es profesor en el “Gene Expression Laboratories”.

De 2005 a 2013 también fue Director de Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (España).

Excmas. Autoridades, Sras. y Sres., nos encontramos ante un investigador con Mayúsculas, un investigador profesional que disfruta de dedicación plena a esta tarea.

En su tarea investigadora ha escalado el más alto cargo investigador en el mundo de hoy. Jefe de Investigación de la Rama Celular y Genética de la Jolla, San Diego, California, su departamento tiene el nombre del Premio Nobel de Medicina Roger Guillemin. Allí está obteniendo enormes progresos en la Medicina Regenerativa y en la Reprogramación Celular. Sobre este tema nos va a hablar en su discurso y es la máxima autoridad mundial.

Dirige un gran departamento de investigación en la Jolla, California, disfrutando de grandes recursos, pues allí entienden bien que todo país que no investiga se empobrece. En su trabajo investigador dedica tanta convicción, conocimientos e intención que arrastra a muchos alumnos a dedicarse a la investigación. Sí, su ejemplo arrastra y su palabra convence.

Publicaciones, libros, conferencias y distinciones

En este apartado, tan grandioso en todos sus aspectos de D. Juan Carlos Izpisua Belmonte, vamos a realizar un gran resumen:

-Ha publicado más de 350 artículos en revistas de alto impacto reconocidos internacionalmente (Nature Science...)

- Ha recibido muchos y destacados premios:

-William Clinton Presidential Award

-Pew Scholar Award

-National Science Foundation Creativity Award

-American Heart Association Established Investigator Award

-Roger Guillemin Nobel Chair

-IESS Juan Carlos Izpisua Belmonte de Hellín

En la investigación biomédica extraemos mecanismos íntimos del funcionamiento de los tejidos y luego ideamos productos para reconducir las células dañadas o para curar las enfermedades. En la investigación tradicional a nosotros nos gusta decir que el “paciente está equidistante del médico práctico y del investigador”. Lucha nuestro D. Juan Carlos Izpisua Belmonte porque sus investigaciones tengan aplicaciones prácticas, es decir hacer rentable el trabajo investigador.

El investigador como el navegante, primero descubre y luego coloniza. Es tanto como decir que primero se muestra lo nuevo, lo novedoso y luego se establecen las pautas de aplicación práctica.

Me he sentido como “UN LEGO DE TOGA CORTA” de los que caminaron alertas, ansiosos y ocupados en el aprendizaje por los hospitales,

libros y congresos (salvando las distancias) mientras escribía el Laudatio de este gran Investigador Español.

Su breve currículum vitae, que hemos expuesto, es una muestra de sus trascendentes publicaciones, asistencias a congresos, conferencias y distinciones logradas en su exitosa carrera.

El profesor-investigador une a su gran capacidad intelectual una enorme capacidad de trabajo y de excelencia en ella misma.

DOCTOR HONORIS CAUSA es la expresión latina que significa “por sus méritos”, es el título de máximo prestigio en una Universidad y se concede a modo honorífico, en reconocimiento a los méritos personales y profesionales.

El tema que va a exponer es “Células Madre, Reprogramación Celular y Medicina Regenerativa: ¿Realidad o Ciencia Ficción?”

Acabo indicando que tras muchos trabajos científicos, ahora su último objetivo es investigar en el desarrollo de nuevas moléculas y específicos genes para tratar enfermedades que afectan a toda la humanidad.

Por todo lo expuesto y en reconocimiento a sus méritos, solicito se proceda a investir a los Doctores René Verdonk (Bélgica) y Juan Carlos Izpisua Belmonte, del grado de “Doctor Honoris Causa” por la Universidad Católica San Antonio de Murcia.

“His de causis, peto gradum, Doctori Honoris Causa Dominis Juan Carlos Izpisua Belmonte et René Berdonk”.

**CÉLULAS MADRE, REPROGRAMACIÓN
CELULAR Y MEDICINA REGENERATIVA:
¿REALIDAD O CIENCIA FICCIÓN?**

Discurso del Dr. D. Juan Carlos Izpisua Belmonte
Profesor-Investigador del Laboratorio de Expresión Génica del Instituto
Salk de Estudios Biológicos de La Jolla (California, EE.UU.)

en su Investidura como Doctor Honoris Causa
por la Universidad Católica San Antonio de Murcia

1. Introducción

1.1. Generación, regeneración y plasticidad celular: *una revisión histórica*

Con la llegada del siglo XXI todavía no somos capaces de conducir coches voladores o de viajar a la luna para visitar un centro comercial, pero sí hemos conseguido avances significativos para alcanzar otros sueños que quizás no tengan un toque tan fantástico para las vidas de las personas. Probablemente el mejor ejemplo de los cambios que han experimentado nuestras vidas gracias a la tecnología sea el continuo e incluso abusivo uso de las redes de información, concretamente de Internet. Además, los avances tecnológicos no son los únicos resultados de la investigación de vanguardia. Y lo que es más importante, el prolífero momento que está viviendo el campo médico, así como el prometedor futuro que tenemos en nuestras manos, implica que algunas ideas tardan tiempo en desarrollarse; a veces son rápidamente aceptadas y otras veces tardan varios años en implantarse hasta conseguir romper un dogma científico. Sin duda, la ciencia dogmática es una parte profunda de nuestro conocimiento actual y quizás no hubiera sido posible soñar lo que soñamos sin la enorme influencia histórica que tuvieron los gobiernos, las políticas cambiantes y la religión en nuestras investigaciones. ¿Podría alguien imaginar trasladar el concepto de las células madre a Lamarck, Linnaeus o incluso Galileo? La idea ha estado siempre subyacente en la mente de no tan sólo los prominentes científicos de una era relativamente moderna, sino también de la impresionante época de los griegos, romanos y egipcios, en la que el conocimiento estaba en manos de filósofos y eruditos. En la mitología griega, Prometeo tuvo relación con el concepto de la regeneración y sus implicaciones. Encadenado a una roca en el Cáucaso, su hígado era comido cada noche por las águilas para regenerarse al día siguiente, lo que implica el concepto subyacente de su inmortalidad. De hecho, la ciencia tradicional se basaba en gran medida en la observación y en los hallazgos fortuitos. Siendo la regeneración quizás una de las demostraciones más sorprendentes del poder de la naturaleza que uno puede observar, es fácil imaginar a nuestros antecesores hacerse la pregunta de si algunos animales eran capaces de regenerar sus miembros ¿por qué no los humanos? A principios del siglo XVIII, René-Antoine Ferchault de Reaumur realizó el primer trabajo científico sobre este tema mediante la demostración y la descripción de la regeneración

de las extremidades y de las pinzas de los cangrejos de río. Bajo la influencia de este trabajo, Abraham Trembley siguió estudiando la regeneración con la observación de los pólipos. Su estudio demostró la capacidad regenerativa de los pólipos de agua dulce después de cortar continuamente el animal en pedazos. Su observación redundó en el descubrimiento de que los pólipos pueden regenerar individuos completos y formar pólipos de varias cabezas, llamados Hidra en honor al personaje mitológico. A finales de la década de 1760, el italiano Lazzaro Spallanzani centró sus estudios en la potencial regeneración de los vertebrados y de los invertebrados. Su obra, publicada en 1768, describe la regeneración de las colas, extremidades y mandíbulas de las salamandras. Asimismo discutió la capacidad de los renacuajos para regenerar sus colas, así como la capacidad de las babosas y de los caracoles para regenerar sus cuernos y sus cabezas. También confirmó las observaciones anteriores de Charles Bonnet sobre la capacidad regenerativa de las lombrices. Ciertamente, la regeneración fascinó, y sigue fascinando, a un gran número de filósofos, naturalistas y científicos; no obstante, no fue hasta hace relativamente poco que empezaron a entenderse las observaciones empíricas sobre los fundamentos de la biología celular y el potencial subyacente de las células madre.

1.2. El nacimiento de la investigación de las células madre

¿Qué son las células madre? Desde el punto de vista embriológico, las células madre son las células capaces de generar un organismo multicelular completo. Quizás el concepto en sí mismo podría interpretarse como sencillo y obvio debido a la observación, pero costó más de 30 años definir realmente la identidad de las células madre y crear unas condiciones experimentales fiables para el nacimiento de la investigación de las células madre. En la evolución animal, el cigoto podría ser considerado la célula totipotente inicial. El cigoto, el óvulo fecundado, es capaz de generar todos los linajes celulares del embrión, del feto y del adulto, incluido el tejido extraembrionario. Por tanto, tiene sentido suponer que si una sola célula puede desarrollar un organismo completo, esta célula tiene la capacidad de generar todos los tejidos posibles. Además, la respuesta a la pregunta de la posible resistencia de una población de células pluripotentes autorrenovables ha sido vaga durante décadas. De hecho, el mejor ejemplo de la tradicional creencia de la diferenciación direc-

cional en tejidos especializados es el paisaje de Waddington (Waddington, 1957). En esta situación jerárquica, la célula totipotente inicial pierde progresivamente su competencia a través de varios pasos consecutivos de especificación y diferenciación. Por consiguiente, el desarrollo escalonado implica la generación de células pluripotentes, capaces de generar todos los tejidos de un organismo adulto, de células multipotentes, con la capacidad de generar unos cuantos linajes celulares distintos pero no todos, y de células unipotentes, capaces de generar un solo tipo de células especializadas. En realidad, tanto el interés tradicional de los biólogos del desarrollo y de los filósofos de la regeneración, como el trabajo inicial sobre la identificación celular, fueron en cierto modo independientes entre sí. Aunque la regeneración propiamente dicha constituía una de las cuestiones humanas científicas más evidentes, el campo de las células madre no retomó estos estudios en sus inicios. De hecho, el campo de las células madre comparte más sus orígenes con el campo oncológico que con ningún otro tema de estudio científico. Actualmente, ninguno de estos campos son independientes y todos ellos comparten una estrecha relación en base a dos grandes propiedades, la capacidad para la auto-renovación y la habilidad para diferenciarse en un número de linajes celulares. Ahora combinemos la discusión anterior sobre el vago concepto de las células pluripotentes que se mantienen en el organismo adulto con las observaciones sobre la regeneración en los vertebrados e invertebrados. En la ciencia contemporánea es en cierta manera “fácil” ver la relación y entender que si los animales son capaces de regenerar hasta cierto punto órganos o tejidos, debe haber una población de células potencialmente capaz de generar todos los diferentes tipos de células especializadas por lo que, por definición, el trabajo histórico sobre la regeneración contemplaba de hecho la actividad de las células madre. No obstante, las cosas no son tan fáciles como se pintan aquí, y es muy probable que el conocimiento actual discuta este concepto tan minimalista. En realidad, la capacidad de regenerar no implica solamente a un grupo endógeno de células residentes, las células madre, capaces de diferenciarse en un número de tejidos sino que también, tal como comentaremos posteriormente, puede producirse un número de procesos distintos. Estos procesos quedan perfectamente ilustrados en el paisaje de Waddington. Tal como hemos comentado antes, el paisaje describe cómo las “células madre” pierden su capacidad para diferenciarse en otro tejido; sin embargo, el hecho de los atajos transversales, concretamente de la conversión/transdiferenciación/trans-

determinación de los linajes, ha sido descrito recientemente (Graf y Enver, 2009). Además, en determinadas circunstancias, las células diferenciadas pueden “revertir” su estado diferenciado y transformarlo en una situación en la que se consigue la proliferación celular y la capacidad de generar un número reducido de tipos celulares (Jopling et al., 2010). Una nueva mirada al pasado demuestra que estos conceptos no son quizás tan innovadores como creíamos. Thomas Hunt Morgan no tan solo fue un científico pragmático sino también un fantástico observador. Resulta llamativo que la capacidad para la observación de Morgan le permitiera “atrapar” el primer mutante de ojos blancos de la *Drosophila* (mosca de la fruta) cuando esta entró volando por su ventana y la cruzó hasta obtener las cepas mutantes, lo que provocó la proyección de la genética a una carrera frenética que sentó las bases de la biología moderna. Además, la leyenda dice que la genética fue el “segundo amor” de Morgan después de la regeneración. De hecho, Morgan fue el primero en instaurar el término morfaxis y epimorfosis para definir dos tipos distintos de regeneración: la que se produce a falta de una proliferación celular activa y la que conlleva una proliferación celular masiva. Además, la regeneración parecía ser un problema imposible de resolver, lo que hizo que Morgan abandonara su interés en la regeneración y dedicara sus esfuerzos a resolver la cuestión “más fácil” de la herencia. Es posible que Morgan hubiera disfrutado e incluso hubiera arrojado una luz esclarecedora sobre los descubrimientos que se produjeron poco después de su muerte. En 1954, nueve años después de la muerte de Morgan, Stevens y Little describieron por primera vez la formación espontánea de teratomas testiculares en ratones endogámicos, así como la generación de estos tumores mediante el trasplante de células germinales primordiales y embriones tempranos, es decir, el trasplante de células pluripotentes (Stevens y Little, 1954). Poco tiempo después, el informe inicial de Stevens y Little se tradujo en la primera generación de estructuras 3D capaces de transferirse a un cultivo y la generación en 1959 de formas ascíticas que contenían cuerpos embrioides por parte de Pierce y Dixon (Pierce y Dixon, 1959). De cualquier manera, e inconscientemente, Pierce y Dixon describieron por primera vez una población de células capaces de autorenovarse, primer criterio básico para la definición de las células madre. Poco después, Pierce y otros demostraron la capacidad de diferenciación de los cuerpos embrioides en los cultivos (Pierce y Verney, 1961; Pierce et al., 1960). Por consiguiente, establecieron la segunda propiedad básica compartida por las

células madre y las cancerígenas, la capacidad de diferenciarse en un número de diferentes linajes celulares. Teniendo en cuenta que el proceso de diferenciación era un completo misterio, pronto se reivindicó que su mecanismo podría ser parecido a la morfogénesis embrionaria. Posteriormente, Pierce y Kleinsmith describieron que las células individualizadas de los cuerpos embrioides eran capaces de generar un teratocarcinoma una vez inyectadas *in vivo* (Kleinsmith y Pierce, 1964). Este hallazgo sentó un precedente y demostró de una manera convincente la presencia de células pluripotentes en la masa del tumor. En consecuencia, las células derivadas del teratoma capaces de autorenovarse así como de diferenciarse en un número de tejidos distintos, recibieron el nombre de carcinoma embrionario (CE). En 1970, dos estudios independientes demostraron la posibilidad de aislar y establecer cultivos celulares clónicos a partir de cuerpos embrioides (Kahan y Ephrussi, 1970; Rosenthal et al., 1970). La clonalidad propiamente dicha constituía la prueba del principio de que las células pluripotentes estaban presentes en el cuerpo embriode y no en las poblaciones celulares previamente constituidas debido al hecho de que la totalidad del proceso podía producirse *in vitro*. La prueba definitiva de la pluripotencia fue el trasplante en animales y la subsiguiente formación de teratomas, una prueba que sigue empleándose en los estudios de reprogramación modernos para demostrar la pluripotencia, tal como se debatirá más adelante y en profundidad en este capítulo. Además de quedar demostrada en los cultivos clónicos, la pluripotencia se observó también como una tendencia general a la reducción de las zonas diferenciadas en cultivos tardíos. De hecho, estos estudios trascendentales se basaban en cultivos originalmente establecidos a partir de líneas tumorales que habían sido en gran parte transferidas. Consiguientemente, pronto se reivindicó que la capacidad de diferenciación de los cultivos clónicos dependía del número de transferencias y del tiempo en cultivo. Un hallazgo fortuito conllevó la implantación de co-cultivos en los que los fibroblastos de pollo irradiados eran utilizados como capa alimentadora (Martin y Evans, 1974). Resulta interesante que el uso de estos alimentadores desembocara en la clasificación de los dos tipos celulares distintos observados en el cultivo de los teratomas, las células con morfología epitelioide llamadas células “E”, mientras que las células pequeñas y de rápida proliferación recibieron el nombre de células “C”. Además, en aquella época no se sabía a ciencia cierta si las células E eran derivados celulares procedentes de la diferenciación de las células C o si, por otro lado,

estas poblaciones distintas ya existían en la masa del teratoma. En 1975, Martin y Evans informaron de un hallazgo importante cuando describieron la posibilidad de inducir una diferenciación dirigida de los cuerpos embrioides formados *in vitro* (Martin y Evans, 1975a, 1975b). Resulta curioso que los autores expusieran en su trabajo varias cosas que siguen siendo perfectamente aceptadas hoy en día. De hecho, en la primera línea de su trabajo afirman: los teratocarcinomas de ratón son una alternativa útil a los embriones para el estudio de la determinación celular de los mamíferos (el proceso por el cual las células multipotenciales se implican en una secuencia de desarrollo especial), así como para el estudio de la consiguiente diferenciación final”. Martin y Evans no tan solo consiguieron establecer las condiciones de diferenciación para la generación de cuerpos embrioides *in vitro*, sino que también demostraron el uso de las capas alimentadoras para la generación de unas poblaciones homogéneas en contraposición a la mezcla de células E y C antes descrita, así como el mantenimiento de la viabilidad celular. En este trabajo trascendental, los cuerpos embrioides diferenciados *in vitro* fueron capaces de generar un número de tejidos distintos que incluían tipos de células presentes en las tres capas germinales tales como células musculares cardíacas y procesos neurológicos así como otros tipos celulares especializados. Además, los autores demostraron las diferencias morfológicas existentes cuando se indujeron células nulipotentes para formar estructuras 3D en comparación con las células de los teratomas. Observaron que las células nulipotentes carecían de una capa endodérmica, lo que redundaba en una capa exterior lisa y la incapacidad de diferenciarse en un derivado celular. De igual modo, los autores descubrieron una tendencia general de las células por diferenciarse una vez eliminados los alimentadores y que las células fueran alimentadas por el medio. En aquella misma época, un estudio independiente de Janet Rossant demostró la formación de una capa endodérmica extraembrionaria cuando se aislaban las células de la masa celular interna (MCI) del embrión de ratón (Rossant, 1975). Por tanto, los autores concluyeron que la diferenciación *in vitro* de las células del teratocarcinoma podría utilizarse para estudiar los casos de determinación y diferenciación de las células, y que la diferenciación de las células de CE sigue el desarrollo embrionario habitual (Martin y Evans, 1975). Además las células de CE procedían del teratocarcinoma y su malignidad era un hecho demostrado, por lo todavía quedaba por demostrar la diferenciación de las células de CE y su paralelismo con el desarrollo embrionario habitual. Tal

como sucede habitualmente en la ciencia, no tardó en producirse la primera demostración del potencial de desarrollo de las células de CE. Varios estudios evaluaron la capacidad de las células de la MCI de contribuir a la formación de animales quiméricos tras la transferencia de blastocistos, aunque estas células seguían procediendo de embriones normales y el único estudio que contemplaba la posibilidad de que las células del CE contribuyeran a la formación de animales quiméricos se basaba en los cuerpos embrioides generados *in vivo* con escaso éxito (Brinster, 1974). Dos estudios independientes publicados en 1975 aclararon posteriormente esta cuestión y demostraron la formación quimérica tras la inyección de células de CE, además de que los animales mostraron una predisposición a la formación de tumores tras el nacimiento o durante su vida (Papaioannou et al., 1975; Mintz e Illmensee, 1975). Y lo que es más importante, no se observó la contribución quimérica a la línea germinal, lo que descarta que las células de CE fueran totalmente idénticas a las células embrionarias. Ahí es donde quizás las células cancerígenas y las células madre empezaron a diferenciarse entre sí. Las células del CE eran células procedentes del teratocarcinoma capaces de formar tumores secundarios tras el retrasplante, y por otra parte las células de CE mostraron un cariotipo anormal, una característica que podría explicar su nula contribución a la línea germinal de los animales quiméricos. De igual modo, a principios de la década de los 70 se extendió rápidamente la noción de que las células de CE eran enormemente parecidas a las células embrionarias tempranas. Una de las principales áreas que apoyaban esta noción fue el descubrimiento de unos antígenos superficiales específicos para las células primitivas de CE no diferenciadas. El trabajo realizado por Artzt y sus colaboradores publicado en 1973 ilustra y aborda perfectamente estas similitudes (Artzt et al., 1973). Los autores sometieron a prueba dos hipótesis subyacentes: en primer lugar, tal como explican elegantemente en su introducción, “cabe esperar que las células del embrión temprano posean determinados antígenos específicos implicados en el desarrollo que posteriormente desaparecen del organismo. Estos antígenos, por consiguiente, deberían evocar una respuesta inmunológica específica en el organismo adulto singénico”. Y en segundo lugar, “si las células PTC poseen estos condicionantes, la hiperinmunización del ratón adulto singénico debería obtener la formación de anticuerpos que reaccionaran no tan solo con las células PTC, sino también con las células del embrión temprano”. Este planteamiento demostró una prueba de principio satisfactoria que,

ciertamente, las células del teratocarcinoma no diferenciadas, definidas como Células del Teratocarcinoma Primitivo (PTC) por Artzt et al., expresan unos antígenos propios de la fase que comporta una respuesta inmunológica, es decir, la generación de antisueros que reconocen las moléculas superficiales. Los autores exploraron además la especificidad de los antisueros generados mediante la prueba de su reactividad con otras células de ratón, incluidas las células diferenciadas. De hecho, solo las células germinales masculinas (origen de la mayoría de los teratocarcinomas) y los embriones en fase de escisión reaccionaron ante los antisueros propios de las PTC. Por consiguiente, las células de CE presentaban unos marcadores de superficie de las células comunes con las células embrionarias y germinales que podían distinguirse de las poblaciones diferenciadas, un hecho que fue posteriormente corroborado y divulgado por otros varios grupos. Al cabo de unos años, el creciente número de marcadores de superficie de células de CE comúnmente identificados con las células embrionarias permitió la percepción generalizada de que las células de CE eran en realidad muy parecidas a las células de la MCI del embrión. Teniendo en cuenta estas similitudes, no se tardó mucho en dilucidar el origen real de los teratocarcinomas, y por consiguiente, de las células de CE. Se constató que los teratocarcinomas procedían de células no malignas normales, una observación que planteó la posibilidad de cultivar células pluripotentes sin la etapa de formación de tumores (Evans, 1981). Dos estudios independientes describieron la generación de líneas pluripotentes mediante el aislamiento de las células embrionarias (Evans y Amufan, 1981; Martin, 1981). Cabe destacar el interés, aunque el artículo de Amufan et al fue publicado antes en Nature, del trabajo de Gail Martin, que con el uso de los medios condicionados por células de CE, fue el primero en referirse a estas células pluripotentes como Células Madre Embrionarias (ES). Estas células presentan todas las características anteriormente observadas de las células de CE y demostraron su capacidad para la diferenciación. Además, las líneas pluripotentes generadas poseían un cariotipo normal. Teniendo en cuenta que las células de CE que poseían un cariotipo anómalo eran incapaces de contribuir a la línea germinal, es decir impedían la manipulación genética, la generación de líneas pluripotentes sin anomalías genéticas abría la posibilidad de generar animales quiméricos a través del quimerismo en la línea germinal. Tuvieron que pasar unos tres años hasta que Bradley y sus colaboradores describieron por primera vez la brillante generación de animales quiméricos a través de la

línea germinal (Bradley et al., 1984), un informe respaldado por una actividad intensa debido a sus implicaciones y sus posibilidades supuestamente infinitas. La generación de animales quiméricos a través de la línea germinal implica la posibilidad de la manipulación genética de los animales, lo que permite la creación de animales transgénicos así como la inducción de mutaciones aleatorias. Los vectores retrovirales fueron la opción elegida para estos primeros estudios sobre la manipulación genética (Robertson et al., 1986). La ingeniería genética en el contexto de un sistema celular tras las fases de desarrollo *in vitro* habituales, así como la capacidad de generar animales transgénicos, abrió la posibilidad de modelar enfermedades mediante con medios sencillos. Por consiguiente, rápidamente se aceptaron las células ES como alternativa al escaso material disponible durante el desarrollo normal del embrión así como sus cambios temporales. Por otra parte, el cultivo *in vitro* de las células ES actúa de depósito eterno para las células pluripotentes, que de este modo pueden ser posteriormente inducidas en las células diferenciadas en el momento en que el investigador lo considere oportuno. Pese a que el rápido avance conseguido en el sistema del ratón sirvió para establecer la noción de las células ES como células pluripotentes capaces de propagarse *in vitro* durante un tiempo ilimitado y un sistema perfecto para el estudio del desarrollo, el hecho fue que las poderosas cuestiones éticas y la escasa cantidad de material obstaculizaron su traslación directa al sistema humano. Sin embargo, son varios los informes que describieron la generación de líneas pluripotentes procedentes de primates no humanos como alternativa a la destrucción de embriones humanos para la generación de líneas de células ES (Thomson et al., 1995). Además, el criterio básico utilizado para la diferenciación de las células de CE de las células ES, es decir la contribución de las células pluripotentes a la línea germinal en los animales quiméricos, fue un fuerte impedimento para la generación y la caracterización de las líneas pluripotentes humanas. No fue hasta 1998 que apareció la primera descripción de la generación de las líneas de células madre procedentes de blastocistos humanos (Thomson et al., 1998). En este informe histórico publicado en Science, Thomson y sus colaboradores establecieron los criterios básicos para la caracterización de las líneas pluripotentes humanas a falta de humanos quiméricos por razones éticas y prácticas. Sin embargo, siguen aplicándose los criterios establecidos por Thomson y que consisten en tres características básicas de la pluripotencia: 1) la derivación de las células de un embrión preim-

plantación o periimplantación, 2) la proliferación prolongada no diferenciada y 3) la capacidad de diferenciarse en derivadas de las tres capas germinales *in vitro*, incluso después de un cultivo prolongado. Los autores de este trabajo utilizaron embriones humanos en fase de escisión obtenidos mediante fertilización *in vitro* y aislaron las CMI tras el cultivo. Las células aisladas eran comparables a otras líneas de ES de primates no humanos previamente establecidas y cumplían todos los criterios preestablecidos para la pluripotencia. Cabe señalar el interés de este trabajo ya que demostró las diferencias según las especies en las líneas de ES pluripotentes, lo que permitió determinar que las células ES humanas son el método más fiable para el estudio del desarrollo humano en contraposición al sistema del ratón. Por consiguiente, todas las líneas generadas expresaron unos marcadores de pluripotencia tales como el SSEA3/4, el Tra1-60 y el Tra1-81 y decididamente marcaron la presencia de fosfatasa alcalina, al igual que en las células ES humanas. Además, tanto las células humanas de CE como las células ES humanas no expresaron el SSEA1, el primer marcador de células madre descrito en las células de ratón.

2. Las promesas de la pluripotencia

El hecho de que las células madre pluripotentes puedan dar origen a todo tipo de células de un organismo, junto con el avance técnico que permite su aislamiento, hace que evoque fantasías tales como la fuente de la eterna juventud y la regeneración eterna y constituya uno de los campos científicos más prometedores con implicaciones clínicas. En el siguiente subcapítulo ofreceremos un resumen de cuáles son las células pluripotentes, de los problemas relacionados con su aplicación y en qué manera contribuyen al desarrollo de la medicina en el futuro.

2.1. Conseguir la pluripotencia en una placa de Petri: *tecnología punta*

2.1.1 *Células del carcinoma embrionario:*

Los estudios realizados sobre las células madre pluripotentes encuentran sus raíces en la descripción de tumores, teratomas (benignos) y orteratocarcinomas (malignos), compuestos por tejidos adultos caprichosamente

dispuestos como los dientes, la piel, el pelo, los huesos, los músculos y otros más. El origen de estos “monstruos” (*teratos* en griego) fue revelado por la descripción de la capacidad de una célula de autorenovarse permanentemente mientras que sus células hijas se diferencian espontáneamente en diversos tipos de células. El estudio de estos tumores no tan solo contribuyeron a la identificación y el aislamiento de las células pluripotentes sino que también establecieron unas bases metodológicas sólidas para la investigación moderna de las células pluripotentes (véase el resumen histórico en **el nacimiento de la investigación de las células madre**). En los informes iniciales se derivaron clónicamente líneas de células de CE tanto de cuerpos embrioides, los conglomerados de células que se parecen a los embriones tempranos y que se encuentran en la conversión ascítica de estos tumores (Rosenthal et al., 1970; Kahan y Ephrussi, 1970) como de teratocarcinomas sólidos (Evans, 1972). Con su trabajo sobre las líneas de teratocarcinomas, Martin y Evans perfeccionaron los métodos que permitían el cultivo de células madre pluripotentes, incluida la expansión de las células de carcinoma embrionario en la capa alimentadora de las células mitóticamente inactivas y la formación *in vitro* de cuerpos embrioides (Martin y Evans, 1974). En términos generales, los trabajos trascendentales sobre las células de CE murinas y humanas permitió el desarrollo de tecnologías que permitieron la derivación de las células diploides pluripotentes procedentes de los blastocistos.

2.1.2. *Células madre embrionarias:*

En la fase inicial de la vida, todos los individuos son unicelulares como consecuencia de la fusión de un gameto masculino y uno femenino. Dado que conservan la capacidad de generar tanto tejidos extraembrionarios como embrionarios, el óvulo fecundado y las primeras 4 células obtenidas por su división, son considerados como totipotentes, es decir capaces de generar un organismo completo. Con la continuación de su desarrollo mediante un proceso de división exponencial, en los humanos la fase de desarrollo de 64 células se alcanza a los 4-5 días siguientes a la fecundación; es la llamada fase de blastocistos. En esta fase se desarrolla una masa celular interna polarizada (MCI) y las células que forman la MCI poseen la capacidad de dar origen a cualquiera de las tres capas germinales que componen los tejidos humanos (endodermo, mesodermo y ectodermo). En 1981, Martin Evans y Matthew

Kaufman informaron por primera vez del establecimiento en un cultivo de tejidos de líneas de células pluripotentes aisladas de cultivos *in vitro* de blastocistos de ratón (Evans y Kaufman, 1981). Tal como se ha mencionado antes, unos meses después, se acuñó el término “Células Madre Embrionarias” (ES) para estas células (Martin, 1981). Sin embargo, tuvieron que pasar 19 años para la publicación del primer informe sobre el aislamiento de las células ES humanas (hES) y que sentó los cimientos de una nueva y amplia área de investigación de las células madre pluripotentes humanas (Thomson et al., 1998). Posteriormente se conocieron otros métodos de derivación de las células CEMH, y todos ellos exigían el mantenimiento en cultivo, hasta la fase de los blastocistos, de los embriones obtenidos por fecundación *in vitro*. La mayoría de estos métodos comprenden el aislamiento de las células de la MCI desde la capa exterior, es decir el trofoectodermo, mediante el uso de procedimientos inmunquirúrgicos, químicos, mecánicos o asistidos por láser (Kim et al., 2005). Con carácter alternativo se utilizó un método de cultivo del embrión completo para establecer las células hES mediante la siembra del blastocisto entero sin su zona pelúcida. El denominador común de estas técnicas es que las células son después sembradas en células alimentadoras, generalmente una monocapa de fibroblastos embrionarios de ratón mitóticamente inactivos, o en placas recubiertas con proteínas de la matriz extracelular que toleran el crecimiento indiferenciado de células hES. Curiosamente, las propiedades de las células ES humanas no son idénticas a las de las células ES del ratón (Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998) pero, entre sus puntos en común, comparten una capacidad “indefinida” de auto-renovación a la vez que conservan su capacidad para diferenciarse en cualquier tipo de células del organismo.

Una alternativa al uso de los embriones obtenidos con las tecnologías de reproducción asistida para la derivación de las células ES consiste en la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) (Wilmot et al., 2002). Gracias a la oveja Dolly (Wilmot et al., 1997), esta técnica consiguió un enorme impacto entre el público. Una vez transferido a un ovocito enucleado, el núcleo de una célula somática es reprogramado por los factores citoplásmicos del óvulo para convertirlo en un óvulo fecundado. Por consiguiente, el óvulo puede desarrollar y alcanzar la fase de blastocisto, momento en el que puede procederse al aislamiento de las células ES y a su mantenimiento en cultivo.

Un informe reciente de Noggle et al. ha demostrado que los ovocitos humanos pueden reprogramar las células somáticas a estado pluripotente (Noggle et al., 2011).

2.1.3 Células germinales embrionarias:

Las células germinales, en su forma final de gametos haploides (espermatozoides y óvulos), son el origen de la transmisión genética que inicia la generación de los organismos. Durante el desarrollo, las células germinales surgen de las células germinales primordiales (CGP) y tienen su origen en el epiblasto antes de asentarse en el reborde gonadal. Aunque las CGP aparecen en una fase de desarrollo más tardía que la de blastocisto, estas células recuerdan a las células ES. Cuando se colocan en unas condiciones de cultivo de células ES después de aislarlas del embrión de ratón (Matsui et al., 1992) o humano (Shamblott et al., 1998), las células germinales embrionarias /CGE muestran las características típicas de la pluripotencia, incluida la capacidad de auto-renovación, la de generar las células de las tres capas germinales y la de formar cuerpos embrioides.

2.1.4 Células madre pluripotentes inducidas:

Teniendo en cuenta que el concepto de la TNCS evidenció la posibilidad de revertir los cambios que rigen la diferenciación, el primer informe sobre las células madre pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés) supuso un cambio radical en nuestra visión actual de las células pluripotentes. En el año 2006, Takahashiy Yamanaka desvelaron al mundo la capacidad de generar experimentalmente células madre pluripotentes de ratón (Takahashi y Yamanaka, 2006) y posteriormente humanas (Takahashi et al., 2007), sin la necesidad de utilizar material embrionario. Utilizando la estrategia de un embudo, sobreexpresaron en fibroblastos de ratón adulto 24 genes previamente identificados como elementos fundamentales para el mantenimiento de la pluripotencia en las células ES. Mediante la exploración de múltiples combinaciones y con un enfoque reduccionista, concluyeron la identificación de 4 factores de transcripción, concretamente el Oct3/4, el Sox2, el c-Myc y el Klf4, lo que permitió la reversión de los fibroblastos de ratón adulto a un fenotipo celular parecido a la célula ES cuando eran

mantenidos en unas condiciones de cultivo de células madre pluripotentes previamente establecidas (ver arriba). Este importante descubrimiento generó un entusiasmo increíble entre la comunidad científica. Posteriormente, el laboratorio Thomson señaló la posibilidad de reprogramar las células somáticas mediante la sustitución de dos “factores Yamanaka”, el c-Myc y el Klf4, por el Nanog y el Lin28 (Yu et al., 2007). A continuación, varios laboratorios indicaron la posibilidad de alcanzar la pluripotencia mediante el uso de 3 (Nakagawa et al., 2008), 2 (Giorgetti et al., 2009) e incluso solo uno de estos factores (Kim et al., 2009b), según el tipo de célula somática inicial. La observación de que el Oct4 es capaz por sí solo de revertir las células madre neuronales en una célula parecida a las ES (Kim et al., 2009b), reveló que el Oct4 es el factor de transcripción básico para la pluripotencia. Dado que los informes iniciales que describían la generación de células iPSC mediante enfoques integradores/basados en virus, incluido el uso de vectores mono y policistrónicos (Carey et al., 2009), los laboratorios de todo el mundo se lanzaron rápidamente a la carrera para desarrollar tecnologías alternativas para evitar la integración del ADN exógeno en el genoma del huésped. Hasta la fecha se han descrito varios métodos de reprogramación sin integración, entre otros: i) virus escindibles de la recombinasa cre (Soldner et al., 2009); ii) adenovirus no integradores (Stadtfeld et al., 2008); iii) plásmidos de expresión (Okita et al., 2008; Kaji et al., 2009); iv) transposones piggyBac (Woltjen et al., 2009); v) vectores episomales (Yu et al., 2009); vi) liberación de proteínas de reprogramación (Zhou et al., 2009; Kim et al., 2009); vii) liberación de ARN mensajeros (Warren et al., 2010). Últimamente se ha señalado la posibilidad de reprogramar las células somáticas mediante la sobreexpresión de un grupo específico de micro ARN (miR-302/367) (Anokye-Danso et al., 2011), lo que aumenta la posibilidad de desarrollar rápidamente otro método de reprogramación sin integración.

Aunque el número de enfoques de reprogramación crece continuamente y varias metodologías parecen haber superado las eficiencias iniciales y el tiempo necesario para la reprogramación, el hecho es que aunque son enormemente parecidas, las células ES y las células iPSC presentan varias diferencias (Phanstiel et al., 2011). Una comparación rigurosa de ambos tipos de células pluripotentes desembocó en la observación de que aunque la expresión génica global estaba enormemente correlacionada, podían observarse

pequeñas diferencias en el ARN mensajero (Chin et al., 2009). Además se ha demostrado que el perfil epigenético de ambos tipos de células es distinto y se ha constatado la memoria epigenética, es decir la conservación de las marcas epigenéticas del tejido somático original, de las células iPSC (Kim et al., 2010; Polo et al., 2010).

2.2. El lado oscuro de las células madre pluripotentes: *la ralentización de las aplicaciones terapéuticas*

La verdad es que las células iPSC no son totalmente idénticas a las células ES. Sin embargo, los científicos están de acuerdo sobre el potencial de esta fuente de células pluripotentes a pesar de estas diferencias. De hecho, la historia de todas las células madre pluripotentes, y no tan solo de las iPSC, puede verse como una montaña rusa con sus subidas y bajadas, lo que refleja las dicotomías relacionadas con lo que define su identidad: su capacidad de auto-renovación y de diferenciación. Teniendo esto en cuenta, en los apartados siguientes discutiremos los motivos por los que, a pesar de la enorme esperanza que despierta su uso, las células madre pluripotentes siguen afrontando problemas que están retrasando su traslado al ámbito clínico.

2.2.1. *Cuestiones éticas*

Hasta hace poco, uno de los principales problemas relacionados con el uso de las células madre pluripotentes humanas era más de índole social que técnico. La necesidad de material embrionario, y su consiguiente destrucción para el aislamiento de las células madre embrionarias (células ES y EGC), ha sido el origen de las disputas, tanto en los escenarios políticos como religiosos, así como entre los medios de comunicación y la propia comunidad científica. De igual modo, la capacidad de generar células pluripotentes mediante el uso de la tecnología TNCS ha despertado el miedo por la posibilidad de la clonación terapéutica, con la que eventualmente podrían utilizarse los clones humanos para curar al individuo “original”. Por este motivo en varios países se han promulgado leyes regulatorias estrictas relacionadas con el uso de las células ES embrionarias y derivadas de la TNCS. Actualmente, gracias al descubrimiento de la reprogramación de las células iPSC, esta preocupación parece haber disminuido y se están

abriendo nuevos caminos para la aplicación de las células pluripotentes en el campo médico.

2.2.2. Riesgos de cáncer asociados con la pluripotencia

Las células EC son una buena introducción para la otra principal cuestión relacionada con el uso de las células pluripotentes. De hecho se ha relacionado la causalidad genética con la elevada incidencia de teratocarcinomas espontáneos en una cepa de ratón concreta (Stevens, 1973). Esta observación sugiere que las mutaciones genéticas podrían ser las responsables del mantenimiento de un estado pluripotente quiescente que posteriormente podría degenerar y comportar la formación de un tumor maligno. Además, el trabajo en el campo del cáncer ha demostrado que las mutaciones en un conjunto de genes en particular, por ejemplo los oncogenes y los genes supresores de tumores, pueden ser el origen de la formación de tumores. Teniendo esto en cuenta, a pesar de la esperanza que despierta el uso de las células madre pluripotentes en las aplicaciones terapéuticas, existen varios problemas graves de seguridad. Por consiguiente, el potencial tumorigénico relacionado con las células pluripotentes obstaculiza enormemente el traslado de los descubrimientos al ámbito clínico.

En 1995, la identificación de las alteraciones genómicas en células ES humanas cultivadas despertó una nueva preocupación en lo que se refiere al uso de las células pluripotentes y de sus derivados para fines clínicos (Maitra et al., 2005). En su estudio, Maitra y sus colaboradores demostraron que el mantenimiento en cultivo de células ES humanas comporta unas alteraciones genómicas habitualmente observadas en los cánceres humanos tales como la variación en el número de copias (CNV) y las modificaciones epigenéticas. Dichas observaciones han sugerido que la metodología de expansión clónica habitualmente utilizada para el mantenimiento en cultivo de las células pluripotentes proporciona un medio para la selección de mutantes que presenten unas características beneficiosas estrechamente relacionadas con las células cancerígenas. La hipótesis de la inestabilidad genómica inducida por el cultivo se vio confirmada por el trabajo de Allegrucci y sus colaboradores en el que demostraron que las líneas de células ES humanas heredan con el tiempo los cambios epigenéticos en el cultivo (Allegrucci et al., 2007). Y lo que es más importante, han demostrado que

estas modificaciones epigenéticas aparecen generalmente poco después de la derivación, y por tanto apoyan la teoría de la selección beneficiosa. Hoy sabemos perfectamente que las células ES humanas comparten numerosos fenotipos celulares y moleculares con las células cancerígenas, tanto en su estado no transformado (diploidía) como tras su transformación en cultivo (aneuploidía) (Knoepfler, 2009; Blum y Benvenisty, 2009, 2008). Lamentablemente, las células iPSC no son la excepción que hace la regla. De hecho, la edad de oro de las células iPSC se vio recientemente alterada cuando una serie de estudios, que utilizaban un amplio espectro de herramientas genómicas como la secuenciación de exomas y las variedades de polimorfismo de nucleótido simple (SNP), demostraron que las células iPSC soportan mutaciones no existentes en las células somáticas iniciales (Gore et al., 2011). Cabe señalar que el laboratorio Zhang identificó, entre 22 líneas de células iPSC analizadas, una media de mutaciones en 5 puntos en las regiones de codificación de las proteínas. Más preocupante es el hecho de que la mayoría de estas mutaciones ($\approx 50\%$) se identificaron en los genes relacionados con el cáncer. Y lo que es más importante, este estudio descartó la posibilidad de que las mutaciones observadas se debieran a las estrategias integradoras de reprogramación. De hecho, Gore et al. observaron un patrón parecido de mutaciones en las células iPSC generadas tanto con enfoques de reprogramación virales (retrovirus/lentivirus) como no virales (ARN mensajero, vector episomal). De igual modo, el laboratorio Loring demostró que puede observarse una mayor frecuencia de CNV en las células ES humanas y en las células iPSC humanas (Laurent et al., 2011). Resulta interesante la identificación por parte de los autores de que las supresiones de los genes supresores de tumores son más propensas a aparecer durante el proceso de reprogramación, mientras que la expansión de las células iPSC humanas parece tolerar la duplicación de los oncogenes. Aunque con un concepto distinto, otros informes han reforzado la idea de que las células somáticas y las células iPSC de por sí se someten a un proceso doble de selección que desecha las células que presentan mutaciones desfavorables en favor de las células que soportan mutaciones y que sustentan su mantenimiento en una célula parecida a las células ES. Se necesita una posterior confirmación para determinar si se trata del caso real. Paralelamente a estos estudios, Lyster et al. destacaron las diferencias en la metilación del ADN existentes entre las células ES humanas y las iPSC humanas. Lister et al., 2011). Importan-

te fue la observación de que las marcas epigenómicas anormales, llamadas Dominios Parcialmente Metilados (PMD), se mantuvieron en las líneas de las células iPSC humanas y posteriormente se transmitieron a derivados diferenciados. En términos generales, la desregulación observada de los genes marcados debido a las condiciones del cultivo (células ES o iPSC) y/o el proceso de reprogramación de por sí, pueden estar relacionados con la tumorigénesis así como con la alteración de la capacidad de diferenciación celular, y por tanto podrían comportar unos resultados negativos en las aplicaciones de las células madre pluripotentes.

Asimismo, además de los riesgos asociados con la mutagénesis por inserción y la posible transformación tumorigénica de las células pluripotentes o de sus derivados, la contaminación de las células diferenciadas con las células no diferenciadas es otro obstáculo que debe salvarse antes de proceder a su traslado al ámbito clínico y a efectos de la medicina regenerativa. Para evitar este problema, se están estudiando en profundidad estrategias que permitan la exclusión de las células pluripotentes restantes de un grupo de células “listas para ser trasplantadas”. El desarrollo de los protocolos de diferenciación (véase a continuación) presenta un doble interés en este contexto. En primer lugar permite la obtención de células (pre)destinadas a un posterior trasplante o a ensayos de prueba de fármacos. En segundo lugar, si la eficiencia de la diferenciación alcanza el 100% permitirá la total eliminación de las células pluripotentes del cultivo. Por ahora no se dispone de un protocolo como este para ningún tipo de células, lo que implica la necesidad de desarrollar unas estrategias alternativas para eliminar las células pluripotentes residuales *in vitro* y/o *in vivo*. Los procedimientos estándar para abolir las células pluripotentes restantes tras la diferenciación confían en el uso de anticuerpos que reconozcan unos determinados marcadores de superficie de las células y los procedimientos de clasificación. Por consiguiente, la selección positiva o negativa de las células pluripotentes / de las células diferenciadas puede llevarse a cabo antes del trasplante (Tang et al., 2009). Además, varios estudios han demostrado que un anticuerpo citotóxico que reconozca la proteína podocalixina puede matar a las células ES humanas (Choo et al., 2008; Tan et al., 2009). A pesar del enorme interés de esta estrategia basada en anticuerpos, deben considerarse los problemas inherentes al uso de los anticuerpos como la

posible activación de las vías descendentes o la inducción de una reacción inmunológica con posterioridad al trasplante. Una serie de informes recientes identificaron un determinado patrón glicoproteínico en las células pluripotentes que podría comportar el desarrollo de unas estrategias vinculadas con la lectina para la exclusión de las células madre pluripotentes de un grupo de células diferenciadas (Toyoda et al., 2011; Wang et al., 2011). No obstante, ninguna de las estrategias actuales de clasificación de las células es lo suficientemente rigurosa para poder reducir el número de células pluripotentes restantes en la población de células clasificadas. Además, la clasificación de las células no evita el riesgo de la diferenciación espontánea *in vivo*, y por tanto es necesario el desarrollo de unas estrategias alternativas. Hasta la fecha, la adaptación de la tecnología del gen suicida, inicialmente desarrollada para el tratamiento del cáncer, representa en el estudio de las células pluripotentes una vía activa de investigación (Schuldiner et al., 2003). El principio consiste en la introducción genética de genes suicidas, normalmente a las órdenes de unos determinados genes promotores pluripotentes, con el objeto de controlar la muerte celular de las células pluripotentes *in vitro* e *in vivo* sin interferir en su pluripotencia ni en su capacidad de auto-renovación (Naujok et al., 2010). Los genes suicidas generalmente codifican enzimas sensibles a los fármacos como el gen de la Timidina Quinasa para el Ganciclovir, y responden al fármaco matando las células en las que se expresan. Otras tecnologías proponen interferir con los genes que son esenciales para el mantenimiento de una condición pluripotente, como el c-Myc, con el objeto de forzar la diferenciación de las células pluripotentes residuales. De igual modo se ha propuesto interferir con los genes relacionados con el teratoma que son prescindible para los tejidos maduros. Por consiguiente, se ha demostrado que la ablación de la expresión superviviente, a través de la genética o con métodos farmacológicos, induce la apoptosis en las células ES humanas (Blum et al., 2009).

En términos generales, aunque todavía no se ha podido demostrar que las células diferenciadas derivadas de las células pluripotentes son propensas a inducir tumores una vez trasplantadas a tejidos de adultos, la supervisión y el estricto control de los productos celulares pluripotentes será sin duda un requisito previo para las aplicaciones médicas.

2.2.3. *Inmunogenicidad asociada con las células pluripotentes*

El uso de células pluripotentes derivadas en aplicaciones clínicas afronta otro obstáculo en caso de considerar el desarrollo de productos celulares aptos para el trasplante. Además de la necesidad de establecer la seguridad de las células pluripotentes y de sus derivados en términos de tumorigenicidad, la superación de las barreras inmunológicas relacionadas con su trasplante constituye también un desafío. Debido a las razones éticas anteriormente comentadas (por ejemplo la clonación terapéutica), así como el posible rechazo inmunológico del trasplante de diferentes células derivadas de las células ES, la medicina regenerativa ha prestado especial atención a las células iPSC así como a otras fuentes alternativas, como las células derivadas de células madre de adultos y las células convertidas en linajes (véanse posteriores apartados). Teóricamente, la reprogramación de las células somáticas en células iPSC ofrece la posibilidad de generar tipos de células personalizadas aptas para el autotrasplante. Sin embargo, un estudio realizado por Zhao y sus colaboradores demostró recientemente que el trasplante de células iPSC no diferenciadas indujo una respuesta inmunológica incluso en trasplantes a animales singénicos (Zhao et al., 2011). Por ahora no está claro el origen de esta respuesta inmunológica y podría deberse a las anormalidades epigenéticas y genéticas adquiridas durante el proceso de reprogramación y durante su posterior mantenimiento en cultivo (véase *Riesgos de cáncer relacionados con la pluripotencia*). Aunque se observó un rechazo inmunológico tras el trasplante de células iPSC en modelos de ratón singénicos, queda por demostrar si las células diferenciadas derivadas de las células iPS producirán la misma respuesta e incluso si, en caso de trasplante de poblaciones puras diferenciadas, dichas células causarán la formación de tumores.

2.3. *Células pluripotentes y diferenciación: aumento de las esperanzas para el ámbito clínico*

Poco después de su primer aislamiento, las células madre pluripotentes, teniendo en cuenta su capacidad para generar prácticamente todos los tipos de células que componen un organismo adulto, ofrecen la posibilidad de estudiar la biología del desarrollo humano en una placa de Petri. Recíprocamente, el conocimiento adquirido por los estudios del desarrollo en otros

sistemas de modelos, ha facilitado nuestra comprensión del compromiso del linaje. Más allá del uso de las células pluripotentes para la revelación de los procesos del desarrollo, la posibilidad de impulsar de forma reproducible la diferenciación de las células madre pluripotentes en una determinada población celular, constituye una enorme esperanza para la curación de numerosas enfermedades, cuyos orígenes se encuentran en una deficiencia o disfunción celular y para las cuales todavía no se han encontrado unas moléculas eficientes. Tal como comentaremos más adelante, la diferenciación de las células madre pluripotentes en un tipo de células clínicamente relevantes, así como la posibilidad de corregir los genes de los genes mutantes, constituyen una alternativa para la terapia celular personalizada, pero también para el desarrollo de unas plataformas útiles para la selección de los fármacos y la modelación de las enfermedades.

2.3.1. *Generación de células clínicamente relevantes en una placa de Petri*

Aunque los mecanismos del desarrollo siguen siendo imprecisos, las lecciones aprendidas gracias a los estudios del desarrollo permitieron una mejor comprensión de los mecanismos que comportan la formación de un organismo multicelular complejo. Siguiendo esta línea, se ha demostrado la importancia de las diferentes vías de señalización que regulan, mantienen e impulsan la diferenciación de las células pluripotentes a lo largo del desarrollo (Young, 2011). Por consiguiente, la raíz de la mayoría de los protocolos de diferenciación *in vitro* confía en la capacidad de los signos extrínsecos para propagarse a través de las vías de transducción de los signos intracelulares que comportan la regulación de los genes concretos que controlan la muerte de las células. Por consiguiente, los factores que se consideran que influyen en la inducción de la capa germinal en el embrión, como el Wnt, el Nodal, el factor β (TGF- β) de transformación del crecimiento, el factor de crecimiento de los fibroblastos y la proteína morfogénica ósea, han sido satisfactoriamente trasladados a protocolos de diferenciación *in vitro* (Gadue et al., 2005; Murry y Keller, 2008). Ejemplo de ello es la necesidad evidente de la señalización de la proteína morfogénica ósea (BMP) para inducir las poblaciones de células mesodérmicas, al menos en la fase inicial de la diferenciación. En general, los protocolos de diferenciación confían normalmente en uno de los tres métodos indicados a continuación: i) la formación de cuerpos embrioi-

des flotantes con anterioridad a la diferenciación; ii) una inducción directa de células madre pluripotentes mantenidas en una proteína de la matriz extracelular; iii) el co-cultivo de células madre pluripotentes en capas de células estromáticas. Sin ser exhaustivos, pueden debatirse varios ejemplos (uno por cada capa germinal) para los que se han contemplado unos protocolos de diferenciación reproducibles. En primer lugar, la diferenciación de las células madre pluripotentes en fenotipos neuronales, incluidas las neuronas, los oligodendrocitos y las células gliales, está siendo constantemente investigada y se han aplicado los hallazgos conseguidos por la biología del desarrollo para controlar tanto el compromiso neuronal de las células pluripotentes como la consiguiente especificación. Por tanto, la identificación de la ruta de señalización Notch, de la proteína Sonic hedgehog, de las familias FGF y TGF- β , así como de las rutas de señalización Wnt como principales protagonistas del establecimiento del neuroectodermo, los progenitores neuronales y las posteriores células neuronales diferenciadas en fase terminal, ha sido fundamental (Aubert et al., 2002; Kubo et al., 2004). Por consiguiente, ahora es posible derivar células funcionales, como las neuronas dopaminérgicas (Perrier et al., 2004) o las neuronas motoras (Wichterle et al., 2002), que presentan un elevado interés en patologías como el Parkinson y la Esclerosis Amiotrófica Lateral, respectivamente. Y lo que es más interesante, no tan solo se ha demostrado la funcionalidad de las células neuronales generadas *in vitro* sino que también se ha demostrado la mejoría de modelos de animales tras el trasplante de células (Kim et al., 2002). Otra población de células de enorme interés para la medicina son las células cardíacas. Después de un ataque cardíaco, se pierden cantidades enormes de cardiomiocitos diferenciados, así como de células vasculares, en la zona dañada del corazón. Por tanto, podría conseguirse la derivación de importantes cantidades de células potencialmente capaces de reponer el corazón mediante la diferenciación dirigida de las células pluripotentes. De hecho se ha demostrado que el trasplante de cardiomiocitos contribuye a la recuperación de la función cardíaca en diversos modelos de animales (Cai et al., 2007). La posibilidad de generar células capaces de mantener una actividad latente en cultivo fue anunciada por primera vez por Doetschmany sus colaboradores (Doetschman et al., 1985). A partir de entonces, una mejor comprensión de estos mecanismos permitió la identificación del BMP4 y de la activina como dos importantes inductores de la diferenciación de los cardiomiocitos después de la inducción mesodér-

mica (Laflamme et al., 2007; Yao et al., 2006). Originadas por el endodermo, las células β pancreáticas son otro tipo de células sorprendentes para los estudios transnacionales. Debido a su capacidad de producir insulina, podría utilizarse el trasplante de células β pancreáticas para el tratamiento de la diabetes tipo I. Nuevamente la generación de células β pancreáticas confía en la síntesis *in vitro*, la activación secuencial de diversas rutas de señalización implicadas en el desarrollo normal de una población celular como esta. En 2006, D'Amour y sus colaboradores demostraron que una serie temporal de modulaciones de la ruta de señalización arbitrada por el factor de crecimiento, era capaz de imitar el desarrollo pancreático y que las células pluripotentes podían diferenciarse en células parecidas a las células β (D'Amour et al., 2006). Otras mejoras del protocolo han demostrado la funcionalidad de las células β derivadas de células pluripotentes tras el trasplante en modelos de animales (Jiang et al., 2007).

En resumen, se ha constatado un número cada vez mayor de protocolos de diferenciación. No obstante, hasta la fecha, ninguno de los protocolos reproducibles permite la generación de poblaciones puras. Además, un estudio reciente ha demostrado unas diferencias de transcripción evidentes entre los derivados de células pluripotentes *in vitro* y sus contrapartidas *in vivo* (Patterson et al., 2011). Este estudio podría explicar por qué a veces las células derivadas de las células pluripotentes no consiguen sintetizar determinadas funciones celulares que se encuentran *in vivo*. Ejemplo de ello son las células madre hematopoyéticas derivadas de células pluripotentes obtenidas con diferentes métodos que raramente, o no con carácter reproducible, contribuyen a la reconstitución del sistema hematopoyético en comparación con el trasplante tradicional de médula ósea. Teniendo esto en cuenta, los esfuerzos destinados al desarrollo de unos protocolos de diferenciación eficientes y aptos para su posterior trasplante en los humanos, por ejemplo sin componentes xenobióticos, así como los destinados a conseguir unas células diferenciadas totalmente funcionales, siguen siendo un área principal de la investigación antes de contemplar el traslado al ámbito clínico. Además, el número de células necesario para el trasplante es fundamental, y por tanto es importante ampliar los cultivos adecuados para satisfacer las demandas celulares necesarias para la aplicación clínica.

En resumen, existen varias cuestiones que obstaculizan el traslado de las tecnologías de las células madre al ámbito clínico, entre ellas las cuestiones éticas, el riesgo de formación de tumores y el rechazo inmunológico, así como el hecho de que la mayoría de las células diferenciadas de las células iPSC humanas parece ser funcionalmente inmadura. Un enfoque alternativo de reciente aparición dirigido por el Dr. Nakauchi y llamado complemento interespecífico de blastocistos, se ha considerado válido en la plataforma *in vivo* para la generación de órganos funcionales a partir de las células PSC. El complemento interespecífico de blastocistos se basa en un “nicho del desarrollo” vacío creado por el noqueo de unos determinados genes fundamentales para el desarrollo natural de un órgano en particular y el uso de células PSC xenogénicas de tipo salvaje para colonizar el nicho vacante y generar las células/tejidos/órganos deseados. El debido desarrollo de este método aumenta la posibilidad de extraer células/tejidos/órganos de animales domésticos que puedan ser trasplantados a los humanos.

3. Conversión del linaje y plasticidad: los niños del futuro de la medicina regenerativa

Teniendo en cuenta todos los posibles inconvenientes que la tecnología de las células iPSC debe superar para encontrar su camino al ámbito clínico, la tecnología ideal para el traslado al ámbito clínico comportará una oportunidad a corto plazo para obtener el linaje celular deseado, un protocolo de diferenciación eficiente y la total abolición de las condiciones pluripotentes, así como unos enfoques no integradores. Siendo conscientes de ello, se han descrito enfoques de reprogramación alternativos que evitan la reprogramación de la pluripotencia. De este modo, la conversión directa del linaje podría constituir un enfoque complementario a la tecnología de las células iPSC. De hecho, tanto la tecnología de las células iPSC como la conversión del linaje confían en el hecho de que el compromiso del linaje depende de un conjunto perfectamente definido de factores de transcripción (TF) (Graf y Enver, 2009). Unos determinados TF bajo el control de las rutas de señalización ascendentes son pues los responsables de activar y mantener el programa genético correcto que garantice la identidad de las células (Scheper y Copray, 2009). Por consiguiente, al igual que en la reprogramación de las células iPSC, la modulación de unos determinados TF así como las rutas

de señalización ascendentes que regulan la actividad de los TF, han abierto la posibilidad de la conversión directa de un linaje en otro. La conversión directa del linaje no implica la reversión a una condición pluripotente y por tanto abrevia el tiempo necesario para obtener los tipos de células deseados. Además, la falta de células madre pluripotentes durante el trasplante debería, por definición, reducir el riesgo de cáncer ya que las células diferenciadas en fase terminal no poseerán la capacidad de auto-renovación y de diferenciación. Y lo que es más interesante, los procesos de conversión del linaje pueden diferenciarse en dos grupos principales: en primer lugar, aquellos procesos en los que unos determinados conjuntos de TF, propios del tipo de células objetivo, son sobreexpresados en la fuente celular inicial para cambiar el programa genético y epigenético de las células y forzar la expresión de los programas que definen la identidad del tipo de células objetivo. Davis y sus colaboradores describieron en 1987 este enfoque por primera vez. La expresión ectópica del MyoD en los fibroblastos de ratón permitió la generación de miotubos (Davis et al., 1987). La conversión de los fibroblastos en miotubos constituyó la “prueba del principio” de la plasticidad celular sin reversión a una condición pluripotente y la posterior diferenciación en un linaje distinto. Otros estudios han demostrado la posibilidad de intercambiar la identidad de las células mediante la introducción de una sola célula (Kulesa et al., 1995; Laiosa et al., 2006) o mediante una combinación de TF(s) (Ieda et al., 2010; Vierbuchen et al., 2010; Pang et al., 2011; Ambasudhan et al., 2011; Caiazzo et al., 2011; Son et al., 2011), así como mediante la ablación *in vivo* de los TF (Nutt et al., 1999). Por otra parte, varios informes recientes han señalado la posibilidad de inducir una conversión más general mediante la inducción parcial de plasticidad sin forzar el regreso de las células somáticas a un estado pluripotente. En una situación como esta, la sobreexpresión de los factores de pluripotencia, como el Oct4, el Sox2, el KLF4 y el c-Mycy/o quizás otras combinaciones, podría empujar a las células a un estado epigenético “abierto” ideal para una posterior manipulación mediante la manipulación de las rutas de señalización (Efe et al., 2011). Por consiguiente, puede utilizarse la combinación de un estado plástico parcialmente desdiferenciado, inducido por factores de pluripotencia pero sin alcanzar la totalidad de la pluripotencia, con unos medios definidos capaces de impulsar la rediferenciación, para la conversión directa de determinadas células somáticas en diversos linajes (Efe et al., 2011; Kim et al., 2011; Szabo et al., 2010).

4. Células madre adultas multipotentes: la alternativa a la pluripotencia

4.1. Aspectos generales

Si retomamos el modelo de paisaje descrito por Waddington, las células madre multipotentes, células progenitoras con un potencial de diferenciación más reducido, ocupan un lugar estratégico en la medicina regenerativa. Capaces de autorenovarse y de dar lugar a un número reducido de tipos de células diferenciadas, las células madre multipotentes desempeñan un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos (Simon y Clevers, 2011). Presentes en unos microentornos definidos que regulan sus propiedades plásticas, los llamados “nichos de células madre”, estas células quiescentes responden a señales extrínsecas que les permiten mantener un grupo de células madre a la vez que generan unas células recién diferenciadas (Jones y Wagers, 2008). Estas células son enormemente prometedoras para el desarrollo de nuevas estrategias curativas, sobre todo porque superan muchas de las advertencias encontradas con el uso de las células madre pluripotentes, y por consiguiente facilitan su traslado al ámbito clínico. Como demostración de ello, las células madre multipotentes pueden derivarse directamente de los tejidos adultos, por lo tanto eliminan las cuestiones éticas relacionadas con las células ES y EG. Además, las células madre adultas no requieren determinadas manipulaciones *in vitro* que podrían comportar mutaciones genéticas, del modo que lo hacen los métodos tradicionales utilizados para la generación de células iPSC. Por último, y en determinadas condiciones, puede contemplarse el autotrasplante de células para evitar el rechazo inmunológico. Paralelamente al aislamiento de las células madre pluripotentes procedentes de los teratocarcinomas, los experimentos pioneros que muestran la reconstitución hematopoyética de los ratones irradiados tras el trasplante de células adultas de la médula ósea fueron los inicios del trabajo sobre las células madre adultas (Ford et al., 1956; Nowell et al., 1956; Makinodan, 1956). Con la sugerencia de la presencia de un tipo de células en un nicho adulto capaz de generar diferentes tipos de células y repoblar un tejido dañado, esta observación revolucionó la antigua visión del cuerpo humano, es decir “lábil, estable y perenne”. (Giulio Bizzozero). A partir de entonces, los avances han

desembocado en la identificación y el aislamiento de las células madre adultas procedentes de otros varios tejidos adultos, incluida la piel, el hígado, los músculos, las diferentes zonas del cerebro, la médula espinal, la nariz, la médula ósea, el corazón y otros muchos. Esta diversidad de tejidos que contienen células madre adultas refleja la diversidad de las células madre adultas que hasta ahora han sido satisfactoriamente aisladas. Por consiguiente, y a diferencia de las células madre pluripotentes, resulta difícil encontrar un consenso general para la caracterización de las células madre adultas, como un determinado conjunto de marcadores, lo que complica aún más su identificación. Generalmente, en base a la observación de las células proliferativas situadas en el interior de una estructura, la prueba definitiva para una célula madre adulta “auténtica” reside en su capacidad de dar lugar a todos o al menos a algunos de los tipos de células del tejido del que han sido aisladas. Las diferentes familias de células madre adultas identificadas hasta la fecha comprenden las células madre neuronales, las células madre mesenquimales (posteriormente referidas como MSC) o las células madre hematopoyéticas. Y lo que es más importante, la mayoría de los métodos que permiten el mantenimiento de las células madre/progenitoras adultas en cultivo y su diferenciación en determinados linajes, están perfectamente establecidos (ver arriba). Además, varios estudios han destacado la eficacia de las células madre adultas o de sus derivadas para el tratamiento de una amplia variedad de modelos experimentales de enfermedades. Por consiguiente, el uso de las células madre/progenitoras adultas se basa en dos métodos distintos: i) el trasplante de células madre/progenitoras adultas; ii) el trasplante de células derivadas de células madre/progenitoras adultas. En general, las células madre adultas son mucho más que una esperanza para el desarrollo de las terapias regenerativas y ya se utilizan en clínicas con carácter rutinario o en ensayos clínicos. Por tanto, y a diferencia de las células madre pluripotentes, no se tardó mucho en trasladar el primer descubrimiento de las células madre adultas al ámbito clínico, tal como lo ilustran las terapias basadas en el trasplante de médula ósea (Little y Storb, 2002). Hasta la fecha, todos los tipos de células madre adultas presentan un interés para el ámbito clínico, pero sobre todo, las células MSC son probablemente las primeras candidatas para el futuro de la medicina regenerativa.

4.2. Células madre mesenquimales: de camino al ámbito clínico

Aunque Arnold Caplan acuñó el término “células madre mesenquimales” (Caplan, 1991), los trabajos de Alexander Friedenstein fueron los primeros que aclararon un segundo tipo de células madre adultas residentes en el nicho de la médula ósea (Friedenstein et al., 1970, 1976). En principio, el término MSC se relacionó con el concepto general de células madre multipotentes, pero se fue adoptando progresivamente para describir las células madre mesenquimales. Además, la literatura carece de un consenso general al respecto y pueden encontrarse ambos términos en referencia a la misma población de células. Independientemente de la nomenclatura, las células MSC fueron descritas por primera vez como capaces de generar tejidos fibrosos y óseos a la vez que conservan las propiedades clonogénicas, y eran conocidas con el nombre de “Unidades de fibroblastos que forman colonias”. De hecho, la forma de un fibroblastoide caracteriza a las células MSC en cultivo y la diferenciación dirigida de las células MSC comportó la satisfactoria generación de varios tipos de células, en función del tejido fuente inicial del que fueron aisladas, incluidos los adipocitos, los osteocitos, los condrocitos, los miocitos, las neuronas, los hepatocitos y los cardiomiocitos. Cabe señalar que además de la médula ósea, las células MSC se han conseguido derivar de muchos otros tejidos adultos, incluido el músculo esquelético, la dermis, el tejido adiposo, el hueso trabecular, el cordón umbilical, la membrana sinovial, el sistema circulatorio, el pericito, la pulpa dental, la nariz, el líquido amniótico, el corazón y otros muchos más (Beyer Nardi y da Silva Meirelles, 2006). Estas diferentes fuentes reflejan, en cierto modo, la heterogeneidad observada en la “súper familia de las células MSC” y cierta variabilidad en su potencial de diferenciación. Y lo que es más importante, la mayoría de estos tejidos son relativamente accesibles, lo que abre la posibilidad de utilizar células MSC para el autotrasplante de células. Dicho esto, el uso de las células MSC en la medicina regenerativa es un campo cada vez mayor con varios ejemplos que muestran un potencial terapéutico prometedor (Uccelli et al., 2011). De igual modo, otros estudios han demostrado que las células MSC pueden desempeñar una acción paracrina beneficiosa para la reparación de los tejidos mediante la secreción de moléculas bioactivas tales como los factores de crecimiento, las citocinas y las quimiocinas (Meirelles et al., 2009). Cabe destacar la identificación de la inmunomodulación mediatizada por las

células MSC (Uccelli et al., 2008) y la migración/incorporación orientada a un determinado tumor (Dai et al., 2011). Esto aumenta la posibilidad de extender el uso de las células MSC para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y del cáncer, respectivamente. De hecho, las promesas del trasplante de células MSC están a punto de convertirse en una realidad clínica si tenemos en cuenta el creciente número de ensayos clínicos relacionados con las células MSC. Especial atención merece el uso de las células MSC en daños/enfermedades cardíacas, enfermedades degenerativas de huesos/cartílagos y en aplicaciones neurológicas e inmunológicas, tanto a través del trasplante directamente en el tejido o a través de la circulación sistémica. Aunque la seguridad de las terapias basadas en las células MSC ha quedado demostrada en muchos ensayos clínicos distintos, la evidencia de la regeneración tisular tras el trasplante es bastante reducida y los resultados conseguidos necesitan nuevas confirmaciones.

5. Edición genética y modelación de las enfermedades

El desarrollo de las tecnologías de edición genética en combinación con la generación de células iPSC específicas para el paciente, constituye una fusión de los campos de las células madre y de las terapias genéticas tradicionales. Las células iPSC derivadas de pacientes que soporten mutaciones monogénicas responsables del desarrollo de las enfermedades son un material ideal para la corrección *in vitro* del gen mutante y para el posterior trasplante de las células corregidas en el paciente. Además, las tecnologías de enfoque genético en células ES de ratón han contribuido enormemente a la comprensión de la función de los genes, del desarrollo animal y de las patologías. No obstante, el traslado del éxito del enfoque genético en las células ES de ratón a las células ES o iPSC humanas, ha sido difícil. La integración aleatoria de los transgenes, una característica común de la mayoría de los enfoques tradicionales de reprogramación, ha sido el método predominante para la modificación del genoma humano en el pasado. Sin embargo, los inconvenientes de este enfoque son ampliamente conocidos, incluido el potencial de mutagénesis por inserción que comporta la formación de tumores. Aunque la integración aleatoria de los transgenes mediada por la transducción viral o los elementos extrapolables sigue manteniendo

su valor en muchas aplicaciones, gracias a su simplicidad y efectividad, el sector ha ido más allá y necesita unas vías más precisas para modificar el genoma humano. De hecho, varias publicaciones recientes han señalado la corrección satisfactoria de los genes que soportan mutaciones y responsables de las enfermedades (Li et al., 2011; Liu et al., 2011b; Soldner et al., 2011; Howden et al., 2011; Papapetrou et al., 2011). Por tanto pueden aplicarse varias tecnologías para la restauración genética de las copias genéticas de tipo salvaje, que en el contexto de una enfermedad monogénica, comporta al final la recuperación fenotípica y la mejora de la función. Por consiguiente, la corrección genética, a diferencia de la terapia genética tradicional en la que se explota la complementación genética en lugar de la corrección del gen mutante, comporta la unión del gen mutante y sus sustitución por una inserción homóloga mediada por la recombinación de la versión del tipo salvaje del gen. Hasta ahora se han desarrollado varias tecnologías distintas, todas ellas con sus ventajas y sus inconvenientes. Además, las cuestiones más habituales relacionadas con el enfoque genético pueden resumirse como sigue: 1) una escasa eficiencia, sobre todo en las células pluripotentes y en los lugares transcripcionalmente inactivos; 2) efectos desfasados manifestados en una elevada toxicidad, una elevada incidencia de la integración aleatoria y otras respuestas mutagénicas debidas al propio proceso del enfoque. Quizás una de las tecnologías más extendidas actualmente es el uso de las nucleasas con dedos de zinc (ZFN) (Hockemeyer et al., 2009; Soldner et al., 2011). En pocas palabras, las nucleasas ZFN son proteínas diseñadas que reconocen unas determinadas secuencias del genoma. La actividad de la nucleasa comporta la generación de roturas de doble cadena del ADN (DSB) que pueden ser reparadas con dos mecanismos endógenos distintos, la recombinación homóloga, que redundante en la corrección adecuada del gen objetivo, y la unión final no homóloga, un mecanismo de reparación del ADN propenso a errores que comporta la generación de mutaciones en el genoma del huésped. Otras tecnologías conocidas hasta ahora, incluido el uso de los adenovirus auxiliar-dependientes (HDAdV) (Suzuki et al., 2008; Liu et al., 2011b), los cromosomas bacterianos artificiales (BAC) (Yang y Seed, 2003), las nucleasas efectoras y activadoras de la transcripción (TALENs) (Cermak et al., 2011), que conjuntamente con el sistema CRISPR/Cas desarrollado últimamente, son algunos de los enfoques más prometedores de la edición genética eficiente. Cabe señalar el hecho de que las amplias aplicaciones de las tecnologías

de edición genética no tan solo cubren la corrección genética sino también la generación de unas líneas de células del reportero exactamente definidas que son enormemente valiosas para el estudio de los procesos de diferenciación habituales y para las pantallas de alta resolución. Además, determinadas sustituciones o desactivaciones de los genes de interés en las líneas de células pluripotentes, constituyen una herramienta inigualable para los estudios moleculares. A este respecto, las células iPSC derivadas del paciente no tan solo suponen una enorme promesa en los términos de la corrección genética y de la medicina regenerativa, sino que también permite realizar un análisis conciso de los mecanismos moleculares que conllevan la manifestación y el avance de una determinada enfermedad. La modelación de las enfermedades presenta pues la posibilidad del descubrimiento y las pruebas de los fármacos *in vitro* el desarrollo de terapias personalizadas (Dimos et al., 2008; Marchetto et al., 2010; Liu et al., 2011a; Brennand et al., 2011). Sin embargo, deben considerarse tres cuestiones importantes respecto al uso de las células iPSC para la modelación de enfermedades antes de su amplia aplicación en los estudios de descubrimiento de fármacos. En primer lugar, teniendo en cuenta la acumulación de anomalías epigenéticas/genéticas durante el proceso de reprogramación, cabe creer que las células iPSC derivadas del paciente pueden presentar funcionalidades anómalas. En este caso, las anomalías genéticas que comportan el desarrollo de las enfermedades pueden contribuir y/o catalizar la reprogramación defectuosa de las células somáticas en las células iPSC, una cuestión todavía no abordada y que puede resultar en una mala interpretación de los resultados. En segundo lugar, dos informes recientes han destacado las importantes diferencias entre las células ESC y las células iPSC en determinados contextos de enfermedades (Urbach et al., 2010).

En tercer lugar, el uso de las células iPSC derivadas del paciente soporta, por definición, otra limitación experimental importante, la falta de unas líneas de control adecuadas. Merece especial atención el hecho de que los defectos epigenéticos/genéticos asociados con la reprogramación, aunque se agrupan en unas rutas relacionadas con el cáncer, parecen ser aleatorios en lo que se refiere a determinados genes. Por tanto, el uso de diversas líneas de células iPSC, las derivadas de un paciente enfermo y las derivadas de individuos sanos, pueden de hecho soportar un número de diferencias

epigenéticas/genéticas que desemboque en una mala interpretación de los resultados durante los estudios de descubrimiento del fármaco y los estudios de modelación de la enfermedad. En este caso un nuevo enfoque debería aprovecharse del desarrollo de unas nuevas tecnologías de edición genética para poder manipular las células pluripotentes y las células ES “auténticas”, y no permitir la corrección genética aunque sí la modificación de las células en dirección contraria y la generación de las células ES propias de la enfermedad (Soldner et al., 2011). En este contexto, la generación de células ES que soporten genes mutantes y responsables de las enfermedades, podría constituir una fuente más fiable de células pluripotentes para la modelación de enfermedades como unión directa de genes de tipo salvaje, y la sustitución de los genes mutantes en las células pluripotentes evitará los pasos de reprogramación y todos sus “efectos secundarios” correspondientes. Siguiendo esta línea, evitar los pasos de reprogramación mediante la generación de las células ES propias de la enfermedad podría atajar la necesidad de validar las células iPSC derivadas del paciente y las posibles conclusiones erróneas que pudieran surgir por el uso de un modelo defectuoso de enfermedad *in vitro*.

6. Conclusiones

El conocimiento actual sobre las células madre y su regulación ha abierto la posibilidad de la manipulación genética de las células somáticas mediante la reprogramación nuclear. La reprogramación nuclear es la reprogramación de la pluripotencia, es decir, la generación de células con unas capacidades parecidas de autorrenovación y de diferenciación a las de las células madre embrionarias. Por tanto, la generación de células iPSC puede extenderse a la derivación de células de pacientes que soportan mutaciones monogénicas responsable de las enfermedades y sintetizadas *in vitro* tras su diferenciación en determinados linajes celulares. Por consiguiente, las células iPSC propias de pacientes pueden utilizarse para la modelación de enfermedades y el desarrollo de fármacos. Además, la rápida expansión del campo ha comportado la comprensión general de que la reprogramación de la transcripción mediada por los factores incluye no tan solo el logro de la pluripotencia sino también otros procesos que pueden comportar la conversión directa de un tipo de células en otro distinto, el proceso de conversión del linaje. Tal como

se ha comentado aquí, la posibilidad de generar *in vitro* todos los tipos de células deseados ofrece la oportunidad de subsanar cualquier daño del tejido perdido mediante la sustitución de las células. Además se han descrito varios problemas, incluida la inestabilidad genética y epigenética y la necesidad de su abordaje antes de su traslado al ámbito clínico. Como alternativa, el descubrimiento de grupos endógenos de células progenitoras multipotentes ofrece la oportunidad de utilizar directamente las células madre sin necesidad de otras modificaciones *in vitro*, lo que de este modo puede conllevar un traslado al ámbito clínico, más directo, tal como lo demuestra el incesante número de ensayos clínicos actualmente en curso. Por último, y teniendo en cuenta que las tecnologías de la edición genética están destinadas indistintamente a las células pluripotentes y a las células madre adultas, podría utilizarse la posibilidad de la corrección genética seguida de un autotrasplante para la curación de las enfermedades monogénicas heredadas por los pacientes. Por consiguiente, la combinación de la terapia genética y el campo de las células madre, abren la posibilidad de una nueva vía de tratamiento.

7. Referencias

- Allegrucci, C., Wu, Y. Z., Thurston, A., Denning, C. N., Priddle, H., Mummery, C. L., et al. (2007) Restriction landmark genome scanning identifies culture-induced DNA methylation instability in the human embryonic stem cell epigenome. *Human molecular genetics*,**16**(10), 1253–1268.
- Ambasudhan, R., Talantova, M., Coleman, R., Yuan, X., Zhu, S., Lipton, S. A., et al. (2011) Direct Reprogramming of Adult Human Fibroblasts to Functional Neurons under Defined Conditions. *Cell stem cell*,**9**(2), 113–118.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C. M., Jühr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., et al. (2011) Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell stem cell*, **8**(4), 376–388.
- Artzt, K., Dubois, P., Bennett, D., Condamine, H., Babinet, C., and Jacob, F. (1973) Surface antigens common to mouse cleavage embryos and primitive teratocarcinoma cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**70**(10), 2988–2992.

- Aubert, J., Dunstan, H., Chambers, I., and Smith, A. (2002) Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. *Nature biotechnology*,**20**(12), 1240–1245.
- Beyer Nardi, N., and da Silva Meirelles, L. (2006) Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of experimental pharmacology*, (174) 249–282.
- Blum, B., Bar-Nur, O., Golan-Lev, T., and Benvenisty, N. (2009) The anti-apoptotic gene survivin contributes to teratoma formation by human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*,**27**(3), 281–287.
- Blum, B., and Benvenisty, N. (2009) The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells. *Cell cycle*,**8**(23), 3822–3830.
- Blum, B., and Benvenisty, N. (2008) The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Advances in cancer research*, **100**, 133–158.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., and Robertson, E. (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, **309**(5965), 255–256.
- Brennan, K. J., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhart, C., Tran, N., Sangar, S., et al. (2011) Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*,**473**(7346), 221–225.
- Brinster, R. L. (1974) The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *The Journal of experimental medicine*, **140**(4), 1049–1056.
- Cai, J., Yi, F.F., Yang, X. C., Lin, G. S., Jiang, H., Wang, T., et al. (2007) Transplantation of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves cardiac function in infarcted rat hearts. *Cytotherapy*,**9**(3), 283–291.
- Caiazzo, M., Dell’anno, M. T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., et al. (2011) Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*,**476**(7359), 224–227.
- Caplan, A. I. (1991) Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*,**9**(5), 641–650.
- Carey, B. W., Markoulaki, S., Hanna, J., Saha, K., Gao, Q., Mitalipova, M., et al. (2009) Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**106**(13), 157–162.
- Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., et al. (2011) Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids research*,**39**(12), e82.
- Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., et al. (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell stem cell*,**5**(1), 111–123.
- Choo, A. B., Tan, H. L., Ang, S. N., Fong, W. J., Chin, A., Lo, J., et al. (2008) Selection against undifferentiated human embryonic stem cells by a cytotoxic antibody recognizing podocalyxin-like protein-1. *Stem cells*,**26**(6), 1454–1463.
- Dai, L. J., Moniri, M. R., Zeng, Z.R., Zhou, J. X., Rayat, J., and Warnock, G. L. (2011) Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy. *Cancer letters*,**305**(1), 8–20.
- Davis, R. L., Weintraub, H., and Lassar, A. B. (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*,**51**(6), 987–1000.
- Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., et al. (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*,**321**(5893), 1218–1221.
- Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *Journal of embryology and experimental morphology*,**87**, 27–45.
- D’Amour, K. A., Bang, A. G., Eliazer, S., Kelly, O. G., Agulnick, A. D., Smart, N. G., et al. (2006) Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*,**24**(11), 1392–1401.
- Efe, J. A., Hilcove, S., Kim, J., Zhou, H., Ouyang, K., Wang, G., et al. (2011) Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nature cell biology*,**13**(3), 215–222.
- Evans, M. (1981) Origin of mouse embryonal carcinoma cells and the possibility of their direct isolation into tissue culture. *Journal of reproduction and fertility*,**62**(2), 625–631.

Evans, M. J. (1972) The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells. *Journal of embryology and experimental morphology*,**28**(1), 163–176.

Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*,**292**(5819), 154–156.

Ford, C. E., Hamerton, J. L., Barnes, D. W., and Loutit, J. F. (1956) Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*,**177**(4506), 452–454.

Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., and Lalykina, K. S. (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics*,**3**(4), 393–403.

Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., and Kulagina, N. N. (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*,**4**(5), 267–274.

Gadue, P., Huber, T. L., Nostro, M. C., Kattman, S., and Keller, G. M. (2005) Germ layer induction from embryonic stem cells. *Experimental hematology*,**33**(9), 955–964.

Giorgetti, A., Montserrat, N., Aasen, T., Gonzalez, F., Rodríguez-Pizà, I., Vassena, R., et al. (2009) Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell stem cell*,**5**(4), 353–357.

Gore, A., Li, Z., Fung, H. L., Young, J. E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., et al. (2011) Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*,**471**(7336), 63–67.

Graf, T., and Enver, T. (2009) Forcing cells to change lineages. *Nature*,**462**(7273), 587–594.

Hockemeyer, D., Soldner, F., Beard, C., Gao, Q., Mitalipova, M., DeKever, R. C., et al. (2009) Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology*,**27**(9), 851–857.

Howden, S. E., Gore, A., Li, Z., Fung, H. L., Nisler, B. S., Nie, J., et al. (2011) Genetic correction and analysis of induced pluripotent stem cells from a patient with gyrate atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**108**(16), 6537–6542.

Ieda, M., Fu, J. D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B. G., et al. (2010) Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*,**142**(3), 375–386.

Jiang, W., Shi, Y., Zhao, D., Chen, S., Yong, J., Zhang, J., et al. (2007) In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell research*,**17**(4), 333–344.

Jones, D. L., and Wagers, A. J. (2008) No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature reviews. Molecular cell biology*,**9**(1), 11–21.

Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Martí, M., Raya, A., and Belmonte, J. C. I. (2010) Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*,**464**(7288), 606–609.

Kahan, B. W., and Ephrussi, B. (1970) Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *Journal of the National Cancer Institute*,**44**(5), 1015–1036.

Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009) Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*,**458**(7239), 771–775.

Kim, D., Kim, C. H., Moon, J. I., Chung, Y. G., Chang, M. Y., Han, B. S., et al. (2009a) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell*,**4**(6), 472–476.

Kim, H. S., Oh, S. K., Park, Y. B., Ahn, H. J., Sung, K. C., Kang, M. J., et al. (2005) Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem cells*,**23**(9), 1228–1233.

Kim, J. B., Sebastiano, V., Wu, G., Araúzo-Bravo, M. J., Sasse, P., Gentile, L., et al. (2009b) Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*,**136**(3), 411–419.

Kim, J., Efe, J. A., Zhu, S., Talantova, M., Yuan, X., Wang, S., et al. (2011) Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**108**(19), 7838–7843.

Kim, J. H., Auerbach, J. M., Rodríguez-Gómez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., et al. (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*,**418**(6893), 50–56.

Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., et al. (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*,**467**(7313), 285–290.

Kleinsmith, L. J., and Pierce, G. B. (1964) Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer research*,**24**, 1544–1551.

Knoepfler, P. S. (2009) Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem cells*,**27**(5), 1050–1056.

Kubo, A., Shinozaki, K., Shannon, J. M., Kouskoff, V., Kennedy, M., Woo, S., et al. (2004) Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development*,**131**(7), 1651–1662.

Kulesa, H., Frampton, J., and Graf, T. (1995) GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblasts. *Genes & development*,**9**(10), 1250–1262.

Laflamme, M. A., Chen, K. Y., Naumova, A. V., Muskheli, V., Fugate, J. A., Dupras, S. K., et al. (2007) Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature biotechnology*,**25**(9), 1015–1024.

Laiosa, C. V., Stadtfeld, M., Xie, H., de Andres-Aguayo, L., and Graf, T. (2006) Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity*,**25**(5), 731–744.

Laurent, L. C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., et al. (2011) Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell stem cell*,**8**(1), 106–118.

Li, H., Haurigot, V., Doyon, Y., Li, T., Wong, S. Y., Bhagwat, A. S., et al. (2011) In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature*,**475**(7355), 217–221.

Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y. S., Hawkins, R. D., Nery, J. R., Hon, G., et al. (2011) Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*,**471**(7336), 68–73.

Little, M. T., and Storb, R. (2002) History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature reviews. Cancer*,**2**(3), 231–238.

Liu, G. H., Barkho, B. Z., Ruiz, S., Diep, D., Qu, J., Yang, S. L., et al. (2011a) Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*,**472**(7342), 221–225.

Liu, G. H., Suzuki, K., Qu, J., Sancho-Martinez, I., Yi, F., Li, et al. (2011b) Targeted Gene Correction of Laminopathy-Associated LMNA Mutations in Patient-Specific iPSCs. *Cell stem cell*,**8**(6), 688–694.

Maitra, A., Arking, D. E., Shivapurkar, N., Ikeda, M., Stastny, V., Kassaei, K., et al. (2005) Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nature genetics*,**37**(10), 1099–1103.

Makinodan, T. (1956) Circulating rat cells in lethally irradiated mice protected with rat bone marrow. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*,**92**(1), 174–179.

Marchetto, M. C. N., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y., et al. (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*,**143**(4), 527–539.

Martin, G. R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**78**(12), 7634–7638.

Martin, G. R., and Evans, M. J. (1975a) Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**72**(4), 1441–1445.

Martin, G. R., and Evans, M. J. (1975b) Multiple differentiation of clonal teratocarcinoma stem cells following embryoid body formation in vitro. *Cell*,**6**, 467–474.

Martin, G. R., and Evans, M. J. (1974) The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell*,**2**(3), 163–172.

Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B. L. (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*,**70**(5), 841–847.

Meirelles, L. da S., Fontes, A. M., Covas, D. T., and Caplan, A. I. (2009) Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & growth factor reviews*,**20**(5-6), 419–427.

Mintz, B., and Illmensee, K. (1975) Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**72**(9), 3585–3589.

Murry, C. E., and Keller, G. (2008) Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*,**132**(4), 661–680.

Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., et al. (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology*,**26**(1), 101–106.

- Naujok, O., Kaldrack, J., Taivankhuu, T., Jörns, A., and Lenzen, S. (2010) Selective Removal of Undifferentiated Embryonic Stem Cells from Differentiation Cultures Through HSV1 Thymidine Kinase and Ganciclovir Treatment. *Stem Cell Reviews and Reports*,**6**(3), 450–461.
- Noggle, S., Fung, H. L., Gore, A., Martinez, H., Satriani, K. C., Prosser, R., et al. (2011) Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state. *Nature*,**478**(7367), 70–75.
- Nowell, P. C., Cole, L. J., Habermeyer, J. G., and Roan, P. L. (1956) Growth and continued function of rat marrow cells in x-radiated mice. *Cancer research*,**16**(3), 258–261.
- Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G., and Busslinger, M. (1999) Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature*,**401**(6753), 556–562.
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*,**322**(5903), 949–953.
- Pang, Z. P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D. R., Yang, T. Q., et al. (2011) Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*,**476**(7359), 220–223.
- Papaioannou, V. E., McBurney, M. W., Gardner, R. L., and Evans, M. J. (1975) Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature*,**258**(5530), 70–73.
- Papapetrou, E. P., Lee, G., Malani, N., Setty, M., Riviere, I., Tirunagari, L. M. S., et al. (2011) Genomic safe harbors permit high β -globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*,**29**(1), 73–78.
- Patterson, M., Chan, D. N., Ha, I., Case, D., Cui, Y., Handel, B. V., et al. (2011) Defining the nature of human pluripotent stem cell progeny. *Cell research*
- Perrier, A. L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M. E., Bruses, J., Topf, N., et al. (2004) Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**101**(34), 12543–12548.
- Phanstiel, D. H., Brumbaugh, J., Wenger, C. D., Tian, S., Probasco, M. D., Bailey, D. J., et al. (2011) Proteomic and phosphoproteomic comparison of human ES and iPS cells. *Nature Methods*,**8**(10), 821–827.
- Pierce, G. B., Dixon, F. J., and Verney, E. L. (1960) Teratocarcinogenic and tissue-forming potentials of the cell types comprising neoplastic embryoid bodies. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*,**9**, 583–602.
- Pierce, G. B., and Dixon, F. J. (1959) Testicular teratomas. II. Teratocarcinoma as an ascitic tumor. *Cancer*,**12**(3), 584–589.
- Pierce, G. B., and Verney, E. L. (1961) An in vitro and in vivo study of differentiation in teratocarcinomas. *Cancer*,**14**, 1017–1029.
- Polo, J. M., Liu, S., Figueroa, M. E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K. Y., et al. (2010) Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*,**28**(8), 848–855.
- Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature biotechnology*,**18**(4), 399–404.
- Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., and Evans, M. (1986) Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*,**323**(6087), 445–448.
- Rosenthal, M. D., Wishnow, R. M., and Sato, G. H. (1970) In vitro growth and differentiation of clonal populations of multipotential mouse cells derived from a transplantable testicular teratocarcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*,**44**(5), 1001–1014.
- Rossant, J. (1975) Investigation of the determinative state of the mouse inner cell mass. II. The fate of isolated inner cell masses transferred to the oviduct. *Journal of embryology and experimental morphology*,**33**(4), 991–1001.
- Scheper, W., and Copray, S. (2009) The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch. *Stem cell reviews*,**5**(3), 204–223.
- Schuldiner, M., Itskovitz-Eldor, J., and Benvenisty, N. (2003) Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a “suicide” gene. *Stem cells*,**21**(3), 257–265.
- Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., et al. (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**95**(23), 13726–13731.
- Simons, B. D., and Clevers, H. (2011) Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell*,**145**(6), 851–862.

- Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G. W., Cook, E. G., et al. (2009) Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*,**136**(5), 964–977.
- Soldner, F., Laganière, J., Cheng, A. W., Hockemeyer, D., Gao, Q., Alagappan, R., et al. (2011) Generation of Isogenic Pluripotent Stem Cells Differing Exclusively at Two Early Onset Parkinson Point Mutations. *Cell*,**146**(2), 318–331.
- Son, E. Y., Ichida, J. K., Wainger, B. J., Toma, J. S., Rafuse, V. F., Woolf, C. J., et al. (2011) Conversion of Mouse and Human Fibroblasts into Functional Spinal Motor Neurons. *Cell Stem Cell*,**9**(3), 205–218.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, **322**(5903), 945–949.
- Stevens, L. C. (1973) A new inbred subline of mice (129-terSv) with a high incidence of spontaneous congenital testicular teratomas. *Journal of the National Cancer Institute*,**50**(1), 235–242.
- Stevens, L. C., and Little, C. C. (1954) Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**40**(11), 1080–1087.
- Suzuki, K., Mitsui, K., Aizawa, E., Hasegawa, K., Kawase, E., Yamagishi, T., et al. (2008) Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**105**(37), 13781–13786.
- Szabo, E., Rampalli, S., Risueño, R. M., Schnerch, A., Mitchell, R., Fiebig-Comyn, et al. (2010) Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature*,**468**(7323), 521–526.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., et al. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*,**131**(5), 861–872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*,**126**(4), 663–676.
- Tan, H. L., Fong, W. J., Lee, E. H., Yap, M., and Choo, A. (2009) mAb 84, a cytotoxic antibody that kills undifferentiated human embryonic stem cells via oncosis. *Stem cells*,**27**(8), 1792–1801.
- Tang, C., Lee, A. S., Volkmer, J. P., Sahoo, D., Nag, D., Mosley, A. R., et al. (2011) An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells. *Nature Biotechnology*,**29**(9), 829–834.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., et al. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*,**282**(5391), 1145–1147.
- Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., et al. (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**92**(17), 7844–7848.
- Toyoda, M., Yamazaki-Inoue, M., Itakura, Y., Kuno, A., Ogawa, T., Yamada, M., Akutsu, H., et al. (2011) Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. *Genes Cells*,**16**(1), 1–11.
- Uccelli, A., Laroni, A., and Freedman, M. S. (2011) Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet neurology*,**10**(7), 649–656.
- Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews. Immunology*,**8**(9), 726–736.
- Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G. Q., and Benvenisty, N. (2010) Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*,**6**(5), 407–411.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C., and Wernig, M. (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*,**463**(7284), 1035–1041.
- Waddington, C. (1957) *The Strategy of the genes, a discussion of some aspects of theoretical biology* (London: G. Allen and Unwin).
- Wang, Y. C., Nakagawa, M., Garitaonandia, I., Slavin, I., Altun, G., Lacharite, R. M., et al. (2011) Specific lectin biomarkers for isolation of human pluripotent stem cells identified through array-based glycomic analysis. *Cell research*
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y. H., Li, H., Lau, F., et al. (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell stem cell*,**7**(5), 618–630.

- Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J. A., and Jessell, T. M. (2002) Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*,**110**(3), 385–397.
- Wilmot, I., Beaujean, N., de Sousa, P. A., Dinnyes, A., King, T. J., Paterson, L. A., et al. (2002) Somatic cell nuclear transfer. *Nature*,**419**(6907), 583–586.
- Wilmot, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K. H. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*,**385**(6619), 810–813.
- Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., et al. (2009) piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*,**458**(7239), 766–770.
- Yang, Y., and Seed, B. (2003) Site-specific gene targeting in mouse embryonic stem cells with intact bacterial artificial chromosomes. *Nature biotechnology*,**21**(4), 447–451.
- Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G. M., Hayek, A., et al. (2006) Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**103**(18), 6907–6912.
- Young, R. A. (2011) Control of the embryonic stem cell state. *Cell*,**144**(6), 940–954.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I., and Thomson, J. A. (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*,**324**(5928), 797–801.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, et al. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*,**318**(5858), 1917–1920.
- Zhao, T., Zhang, Z. N., Rong, Z., and Xu, Y. (2011) Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*,**474**(7350), 212–215.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J. Y., Zhu, S., Han, D. W., Lin, T., et al. (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell stem cell*,**4**(5), 381–384.

REPARACIÓN MENISCAL Y SUSTITUCIÓN: ¿DÓNDE ESTAMOS?

Discurso del Dr. D. René Verdonk

Profesor Emérito y ex Director del Departamento de Ortopedia
y Traumatología de la Universidad Estatal Gent (Bélgica)

en su investidura como Doctor Honoris Causa
por la Universidad Católica San Antonio de Murcia

Indicaciones y técnicas para el uso de aloinjertos meniscales en la rodilla

Doctor R. Verdonk, Doctorado en medicina, Doctor K.F. Almqvist, Doctorado en medicina, Doctor P. Verdonk, Doctorado en medicina

| | |
|-------------------------|-------------------------------|
| Título | Doctor, doctorado en medicina |
| Nombre del autor | René Verdonk |
| Universidad o compañía | Ghent State University |
| Facultad o departamento | Facultad de Medicina |
| Calle | St Pietersnieuwstraat |
| C.P., ciudad | B 9000 Gent |
| País | Bélgica |
| E-mail | rene.verdonk@ugent.be |
| Teléfono | +32 9 2215166 |

| | |
|-------------------------|-------------------------------|
| Título | Doctor, doctorado en medicina |
| Nombre del autor | Peter Verdonk |
| Universidad o compañía | Monica Hospitals Antwerpen |
| Facultad o departamento | Antwerp Orthopaedic Center |
| Calle | Harmoniestraat 68 |
| C.P., ciudad | B 2000 Antwerpen |
| País | Bélgica |
| E-mail | pverdonk@yahoo.com |
| Teléfono | +32 3 2402272 |

| | |
|-------------------------|-------------------------------|
| Título | Doctor, doctorado en medicina |
| Nombre del autor | Karl F. Almqvist |
| Universidad o compañía | Ghent State University |
| Facultad o departamento | Facultad de Medicina |
| Calle | Sint Pietersnieuwstraat |
| C.P., ciudad | B 9000 Gent |
| País | Bélgica |
| E-mail | Fredrik.almqvist@ugent.be |
| Teléfono | +32 497 241467 |

1. Resumen

Los trasplantes de aloinjertos meniscales han supuesto un tratamiento útil para pacientes seleccionados cuidadosamente. Casi todos los estudios, tanto a corto como a largo plazo (>10 años de seguimiento), muestran la satisfacción y mejora de los pacientes respecto al dolor y las funciones.

Objetivamente, los resultados de los exámenes físicos se mejoran en la mayoría de pacientes. Radiológicamente, el estrechamiento del espacio articular sólo es significativamente progresivo con un seguimiento a largo plazo. En las imágenes por resonancia magnética (IRM), la contracción se ve tras algunos años, pero es más visible en aloinjertos liofilizados. Histológicamente, se percibe una repoblación incompleta del injerto. Una artroscopia de reevaluación suele mostrar una buena curación de la cápsula. En un estudio a largo plazo reciente, se detuvo en un número de pacientes una progresión de degeneración de cartílago según criterios radiológicos y tomados a partir de la IRM, ya que presentaba un efecto condroprotector.

Sin embargo, sigue habiendo falta de consenso sobre cómo debe evaluarse el éxito en los trasplantes meniscales, lo que hace difícil comparar los resultados de los estudios. En nuestra opinión, la medición radiográfica del estrechamiento del espacio articular y los cambios en la señal RM del aloinjerto meniscal son las mejores herramientas de evaluación, pero sigue siendo esencial el uso de un buen sistema de evaluación clínica como los sistemas de puntuación del International Knee Documentation Committee (JKDC) y el Hospital for Special Surgery (HSS).

2. Indicaciones

Según recomendaciones recientes, el trasplante de aloinjerto meniscal está indicado para tres ámbitos clínicos específicos:

1. Pacientes jóvenes con una historia de meniscectomía que tengan dolor localizado en el espacio donde se encuentra el menisco que presenta deficiencias, articulación de la rodilla estable, ninguna malalineación y cartílago articular con evidencias mínimas de cambios degenerativos osteocondrales (que no sean mayores al grado 3 según el sistema de clasificación de la International Cartilage Repair Society [ICRS] [Tabla 1]) se consideran candidatos

ideales para este procedimiento. Algunos estudios [1-6] han demostrado que los aloinjertos meniscales pueden sobrevivir en una articulación osteoartrosica (grado de Outerbridge 3-4) con una mejora significativa del dolor y la funcionalidad. Debido al deterioro más rápido del espacio lateral [7], una indicación relativamente común para el trasplante meniscal sería un espacio lateral sintomático del menisco deficiente.

2. Los pacientes con deficiencia en el ligamento cruzado anterior (LCA) a los que se les ha realizado previamente una meniscectomía con reconstrucción del LCA concomitante y que pueden beneficiarse de la estabilidad incrementada proporcionada por un menisco medial funcional. El autor está convencido de que un injerto del LCA está tan bien protegido por el aloinjerto meniscal como el menisco lo está por un injerto de LCA.

3. En un esfuerzo por evitar una degeneración articular temprana, hay quien considera a los pacientes jóvenes y atléticos a los que se les ha practicado una meniscectomía completa como candidatos para el trasplante meniscal previo a la aparición de los síntomas [8]. Sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora siguen impidiendo la vuelta a deportes de alto impacto.

3. Contraindicaciones

La degeneración condral avanzada se considera una contraindicación al trasplante de aloinjerto meniscal, aunque algunos estudios sugieren que la degeneración de cartílago no supone un factor de riesgo significativo para el fracaso [9]. En general, según el sistema de clasificación de la JCRS, las lesiones de cartílago articular mayores de grado 3 deben estar en una superficie limitada y estar localizadas. Los defectos condrales localizados pueden tratarse de forma concomital, ya que el trasplante meniscal y la regeneración y restauración de cartílago pueden beneficiarse mutuamente en términos de curación y resultados [10]. El trasplante de condrocitos o los procedimientos para realizar injertos osteocondrales deben realizarse después de que se haya completado el trasplante meniscal para prevenir daños accidentales en el parche o injerto durante la inserción del aloinjerto meniscal [11]. Las pruebas radiográficas de la formación por osteofitos significativa o del aplanamiento de cóndilo femoral se asocian con resultados posoperatorios inferiores porque estas modificaciones estructurales alteran la morfología del cóndilo fe-

moral [12]. Generalmente, los pacientes mayores de 50 años tienen un exceso de lesiones de cartílago y no son candidatos óptimos. La malalineación axial tiende a ejercer una presión anormal en el aloinjerto, que lleva al aflojamiento, degeneración o fallo del injerto [12]. Debe considerarse la osteotomía correctiva en pacientes con más de dos

grados de desviación hacia el espacio en cuestión respecto al eje mecánico del miembro contralateral. La deformidad en varo o en valgo puede corregirse

con una osteotomía femoral distal o de tibia superior tanto por fases como concomitante. Sin embargo, como en cualquier situación en la que se combinan procedimientos, no está claro qué

aspecto del procedimiento se ve envuelto en la resolución de los síntomas, como el alivio del dolor [12]. Otras contraindicaciones para el trasplante meniscal son la obesidad, la inmadurez ósea, inestabilidad de la articulación de la rodilla (que puede abordarse junto con

el trasplante), enfermedad sinovial, artritis inflamatoria, infección articular previa y cuadratura obvia del cóndilo femoral.

4. Técnica para el trasplante meniscal

4.1. Consideraciones del preoperatorio

En contraposición al uso de aloinjertos ultracongelados, para aloinjertos viables es obligatorio seguir un programa estricto desde la recogida hasta el trasplante. El trasplante de aloinjertos meniscales viables implica la disponibilidad de tejidos viables de un donante cultivados in vitro inmediatamente después de la recogida. El cálculo del tamaño del injerto es crucial para una correcta implantación. En aloinjertos ultracongelados, la longitud mediolateral y anteroposterior de la meseta tibial del receptor se miden en rayos X calibrados y se transfieren al banco de tejidos. Dado que un aloinjerto meniscal viable está más limitado respecto a las opciones de tamaño debido a que sólo hay un donante y un número limitado de receptores, se elige el receptor más apropiado en base a criterios de altura y peso de los correspondientes donante y receptor. Una vez que se considera que el paciente es candidato para este tipo de procedimiento, se preparan entre 30 y 50 ml

de suero autólogo y se congela a -21°C. El tiempo de espera medio para un aloinjerto meniscal viable es de dos meses (que puede ir de 14 días a 6 meses) en nuestra institución. Una vez se tiene un cultivo de un aloinjerto meniscal de tamaño apropiado, se notifica al paciente y se planifica para realizarla en los 14 próximos días.

4.2. Técnica quirúrgica

4.2.1 INTRODUCCIÓN

El cometido de este capítulo técnico es presentar trasplantes de aloinjerto meniscal medial y lateral (1) como procedimiento abierto o (2) como procedimiento asistido con artroscopia. En ambas técnicas se utiliza la fijación de tejido blando primario del aloinjerto en el cultivo meniscal nativo. En la técnica de artroscopia se usa la fijación transósea adicional del cuerno posterior y anterior, mientras que en el procedimiento abierto se usan rieles para fijar el tejido blando al hueso.

4.2.2 ANESTESIA Y PREPARACIÓN QUIRÚRGICA

Estos elementos son idénticos para el procedimiento abierto y el artroscópico.

El cirujano, el anestesista y el paciente discuten sobre la elección de la anestesia, que dependerá de la edad, la comorbilidad y el historial del paciente respecto a previas anestesias. En nuestra institución se prefiere la anestesia general.

Luego, se coloca al paciente en posición supina en la mesa de operaciones. Se coloca un soporte para la pierna a la altura del torniquete de modo que la pierna esté flexionada 90 grados. Se utiliza un soporte para el pie para sostener la pierna flexionada entre 90 y 110 grados según sea necesario. Se marcan incisiones en la piel previas. Se desangra el miembro y se infla el torniquete. Luego se prepara el miembro con una solución de alcohol y gluconato de clorhexidina (Hibitane, Regent Medical Overseas Limited, Manchester, Reino Unido) y se cubre a mitad del muslo.

4.2.3 PREPARACIÓN DEL ALOINJERTO PARA EL PROCEDIMIENTO ABIERTO

Como se ha descrito anteriormente, el aloinjerto se coloca y se fija en un panel de corcho especialmente diseñado con tres agujas de calibre 25. [13] Con un escalpelo, se disecciona el tejido sinovial residual para retirarlo del menisco de aloinjerto a la altura de la articulación meniscosinovial y se desecha.

La parte superior del aloinjerto se marca con un marcador azul de metileno para la piel.

Las suturas quirúrgicas polidioxanonas 2/0 horizontales (PDS II en una pequeña aguja doble, Ethicon, Somerville, NJ, USA) o las suturas de polipropileno no absorbible 2/0 (Prolene en una pequeña aguja doble, Ethicon, Somerville, NJ, EE.UU.) se colocan cada 3-5 mm a lo largo del cuerno posterior, el cuerpo y el cuerno anterior del aloinjerto y se fija en un soporte de sutura especialmente diseñado (soporte A). El cirujano jefe (R. V.) prefiere utilizar las suturas de Prolene 2/0 para el cuerno posterior dado que este material de sutura tiene agujas ligeramente más pequeñas y, por lo tanto, la sujeción quirúrgica es más fácil en el espacio más estrecho de la articulación posterior. Las suturas se fijan en el soporte de sutura desde el posterior hasta el anterior. Generalmente, se necesitan de 6 a 8 suturas para cubrir por completo el aloinjerto.

4.2.4 TRASPLANTE ABIERTO DE ALOINJERTO MENISCAL

Se realiza una incisión rotular medial o lateral de aproximadamente 8 centímetros con la rodilla flexionada 90 grados para poder acceder al espacio en cuestión de la articulación de la rodilla. entonces, se abre la cápsula articular y se transecciona el cuerno anterior del remanente meniscal.

Para el procedimiento lateral, se libera subperiostealmente la cintilla iliotibial de su acoplamiento distal. Para abrir más el espacio lateral, la inserción del ligamento colateral lateral (LCL) y el tendón poplíteo (TP) están separados con una osteotomía curvada en el lado femoral. [Figura 1] Primero, se perfora previamente con una fresa de 2,7 mm el centro del bloque óseo de la osteotomía. Esto facilita la refijación subsecuente con tornillo y arandela. La osteotomía se realiza en dirección de las agujas del reloj desde

la posición de las 8 en punto hasta la posición de las 4 en punto y con una profundidad aproximada de 1,5 cm y con forma cónica. El bloque óseo se pliega cuidadosamente con la ayuda de una pinza ósea y luego se completa la osteotomía por la parte inferior desde la posición de las 4 en punto hasta las 8 en punto utilizando un osteótomo. Ahora, el espacio articular lateral puede abrirse con facilidad entre 1 y 2 centímetros poniendo la rodilla en la figura de la posición 4 flexionada de 70 a 90 grados con el pie índice colocado a través del miembro contralateral.

Para el procedimiento medial, el ligamento colateral medial se separa del lado femoral con una osteotomía. [14] Se realiza una osteotomía laminar (de un grosor de 0,5 a 1 centímetros) con la ayuda de un osteótomo recto a la altura del apicóndilo femoral medial. Los tejidos blandos posteriores al ligamento colateral medial se dejan en continuidad. Colocar la rodilla con cuidado en posición de valgo para abrir a continuación el espacio medial de forma controlada.

Se recorta el remanente meniscal preferiblemente hasta conseguir un anillo meniscal estable con un escalpelo por la parte anterior y con instrumentos artroscópicos por la parte posterior. Con frecuencia, la inserción del cuerno posterior sigue intacta y en continuidad con la meseta tibial. El inserción del cuerno posterior también se recorta para que encaje el aloinjerto. El anillo meniscal requiere atención quirúrgica ya que sirve como envoltura fuerte que encapsula el espacio medial y lateral de la rodilla.

El nivel del remanente meniscal se marca entonces con una pinza mosquito pequeña por la parte anterior para que sirva de punto de referencia para el nivel correcto en que se realizará la fijación de aloinjerto. A continuación, el aloinjerto meniscal viable preparado anteriormente se introduce en el espacio de la rodilla. Se retiran las suturas del soporte en el orden correcto, desde la parte posterior hasta la anterior, y se pasan por el anillo meniscal una a una de modo que queden todas dentro desde la parte inferior hasta la parte superior y se transfieren a un soporte de sutura secundario (soporte B), de nuevo, desde la parte posterior hasta la anterior. También se sutura el aloinjerto lateral al tendón poplíteo. Hemos descubierto en artroscopias de seguimiento que el hiato poplíteo se recrea de forma natural. La inserción del cuerno anterior del menisco aún no está suturado en esta etapa de la operación. Una vez que se completa la secuencia de la transferencia de la sutura del soporte A a través del anillo meniscal (y el

tendón poplíteo) hasta el soporte B, se introduce el aloinjerto en el espacio tirando con cuidado de cada sutura desde la parte posterior hasta la anterior. Generalmente, este procedimiento tiene que realizarse progresivamente para que el aloinjerto encaje de forma segura en el anillo meniscal. Los nudos de sutura se atan y cortan con firmeza. Con frecuencia se requiere una aguja de punta fina y un bajanudos para asegurar firmemente las suturas posteriores. Ahora la rodilla vuelve a estar colocada en una posición normal con una flexión de 90 grados. El bloque óseo del ligamento colateral y el tendón poplíteo se vuelve a colocar y se fija utilizando un tornillo de esponja AO 2,9 de 35 a 40 mm con una arandela dentada. El cuerno anterior del aloinjerto se fija entonces a la tibia utilizando un gancho (GII, Depuy Mitek, Raynham, Massachusetts, EE.UU.). La almohadilla grasa de Hoffa y la cápsula de la rodilla se cierran con puntos cruzados Vicryl 1/0 interrumpidos (Ethicon, Somerville, NJ, EE.UU.) después de la hemostasia.

4.2.5 PREPARACIÓN DEL ALOINJERTO PARA EL PROCEDIMIENTO ARTROSCÓPICO

El aloinjerto se posiciona y se fija en un panel de corcho especialmente diseñado con agujas de calibre 25. Con un escalpelo, se disecciona el tejido sinovial residual para retirarlo del menisco de aloinjerto a la altura de la articulación meniscosinovial y se desecha.

La parte superior del aloinjerto se marca con un marcador azul de metileno para la piel.

Se colocan suturas no reabsorbentes de alta resistencia (Fibre wire, Arthrex, Naples, EE.UU.) en el cuerno anterior y posterior del aloinjerto. Generalmente, se colocan 3 pespuntos de unión en el anillo interno y externo del cuerno del aloinjerto. Se coloca una sutura no reabsorbente vertical adicional (Ethibond 2/0, Somerville, NJ, EE.UU.) en la esquina posteromedial o posterolateral del aloinjerto medial o lateral, respectivamente. Para el aloinjerto lateral, se coloca la sutura posterolateral justo en la posición anterior del hiato del tendón poplíteo ya que servirá como punto de referencia durante la artroscopia [Figura 2].

4.2.5.1 Trasplante del aloinjerto meniscal lateral asistido con artroscopia

Se realizan los clásicos portales anteromedial y anterolateral. Se coloca un portal anteromedial en una posición muy medial para conseguir acceder fácilmente con el instrumental al realizar el debridamiento y la resección de la porción anterior del menisco lateral nativo. Se desbrida el remanente meniscal con un rasurador y un punzón hasta la altura del anillo meniscal.

Una guía modificada de LCA con punta de bajo perfil se inserta por el portal medial y se coloca en el cuerno anatómico posterior del menisco lateral justo en la parte posterior del LCA [Figura 3]. Se perfora primero con una espiga de guía para luego sobreperforar con una fresa canulada de 4,5 mm. Se introduce un hilo de metal con asa doble por el túnel desde afuera hacia dentro y se coge intraarticularmente con unas pinzas de agarre artroscópicas y se saca por el portal lateral. Posteriormente, se introduce un conductor de sutura (Acupass, Smith and Nephew, Memphis, Tennessee, EE.UU.) dos veces desde afuera hacia dentro junto en la parte anterior al ligamento colateral lateral y el tendón poplíteo dentro de la articulación: uno justo debajo y el segundo sobre el anillo meniscal nativo [Figura 4]. Los hilos con asa se recogen y se sacan otra vez por el portal lateral. A continuación, la sutura extraíble del cuerno posterior y la del posterolateral se pasan tirando de ellas gracias al hilo con asa doble y al hilo de tracción con asa doble. El aloinjerto lateral preparado se introduce posteriormente en el espacio lateral por un portal lateral agrandado tirando progresivamente de la sutura extraíble posterolateral y de la sutura extraíble del cuerno posterior. Debe tenerse cuidado para que el injerto no se dé la vuelta al introducirlo y los hilos extraíbles no se enreden. El riesgo de que los hilos se enreden se reduce en gran medida al usar un hilo de metal con asa doble en el caso del cuerno posterior.

El cuerno posterior está ahora correctamente colocado. Se puede modificar ligeramente su posición un poco más hacia la esquina posterolateral o hacia el cuerno posterior tirando más del hilo de tracción del cuerno posterolateral o posterior. Se utilizan uno o dos dispositivos de fijación meniscal totalmente internos (Fastfix, Smith and Nephew, Memphis, Tennessee, EE.UU.) para fijar el aloinjerto al anillo meniscal. Se debe comenzar la fijación en la esquina posterolateral. Posteriormente, se utilizan suturas 2/0 Ethibond horizontales invertidas para fijar el cuerpo del aloinjerto. El cuerno anterior se fija en el exterior utilizando PDS o suturas 2/0 Ethibond.

Antes de hacer los nudos de las suturas, el cuerno anterior se introduce en la articulación de la rodilla y el lugar de inserción anatómico se identifica y prepara de la misma forma que el túnel posterior. Si es necesario, se puede adaptar ligeramente la posición a la del injerto. El túnel anterior se prepara de forma similar al procedimiento del cuerno posterior y se tira de la sutura de tracción por él.

Primero, las suturas inversas meniscales se anudan. Luego, las suturas de tracción del cuerno anterior y posterior se anudan entre ellas sobre un puente óseo en el lado anteromedial de la tibia. Este procedimiento reduce la posible aparición de cápsulas estiradas y de anillos meniscales nativos sujetos al aloinjerto meniscal al tirar del cuerno anterior y posterior mediante una fijación de sutura transósea.

4.2.5.2 Trasplante de aloinjerto meniscal medial asistido con artroscopia

Se realiza un procedimiento similar al del aloinjerto lateral para el trasplante del aloinjerto medial. Sin embargo, algunos pasos son diferentes y se subrayarán en este apartado.

Además del clásico portal anteromedial y anterolateral, se debe usar un portal posteromedial para identificar los acoplamientos del cuerno posterior original del menisco nativo [Figura 5]. Los túneles transóseos se pueden preparar utilizando las mismas guías perforadoras. Estos túneles deben prepararse comenzando por el lado anterolateral de la tibia. Esta dirección va más acorde con las fuerzas de las suturas de tracción.

Se utiliza una sutura de tracción posteromedial, en concordancia con el aloinjerto lateral. En la parte medial, sin embargo, falta un punto de referencia anatómico como el hiato poplíteo en la parte lateral.

El cuerno anterior del menisco medial nativo, en algunos casos, puede estar muy adelantado a la meseta tibial, lo que resulta en un túnel anterior transóseo muy corto.

Apunte especial sobre el tejido blando en contraposición con la fijación del bloque óseo. [15-19]

Estudios sobre cadáveres biomecánicos han demostrado la superioridad de la fijación ósea sobre la técnica de fijación de tejido

blando, aunque un estudio reciente sobre cadáveres mostró resultados comparables. Sin embargo, también se ha mostrado que la fijación ósea está asociada a un riesgo incrementado de lesiones de cartílago si se implantan incorrectamente y con un potencial inmunológico incrementado debido a la presencia de hueso alogénico. Por experiencia del autor, la perfecta coincidencia en tamaño del aloinjerto es esencial si se utiliza la fijación ósea. el posicionamiento incorrecto del bloque o de los émbolos óseos puede infligir daños en el cartílago suprayacente. Un injerto muy pequeño resultará necesariamente en la sobretensión de las suturas inversas y el posible fallo de la fijación de tejido blando. Por lo tanto, se aboga comunmente por el sobredimensionamiento limitado del injerto utilizando émbolos o bloques óseos. El hecho de separar los émbolos óseos tiene la ventaja potencial de que la implantación puede ser más variable en cierto modo en comparación con un bloque óseo único. Además, en la parte lateral, a veces, un bloque óseo recto induce a la necesidad de sacrificar algunas fibras posterolaterales del LCA.

Hoy día, no se muestran diferencias clínicas y/o radiológicas entre el tejido blando y la fijación del bloque óseo.

5. Rehabilitación

La rehabilitación se centra inicialmente en procurar la movilidad de la articulación sin poner en peligro el crecimiento hacia el interior y la curación del injerto. Por lo tanto, se prescriben 3 semanas sin cargar peso seguidas de 3 semanas en las que se puede cargar peso parcialmente (el 50% del peso corporal). Se puede realizar una progresión hasta cargar peso por completo desde la semana 6 en adelante hasta la semana 10 después de la operación. No es estrictamente necesario el uso de una rodillera ortopédica y su uso depende de la morfología y el perfil del paciente. Por algunas razones, el rango de movimiento está limitado en las dos primeras semanas de 0 a 30 para incrementarlo en 30 grados cada dos semanas.

Se prescriben desde el día 1 en adelante después de la operación la tonificación muscular isométrica y los ejercicios de co-contracción. Sin embar-

go, se prohíbe levantar la pierna y extenderla durante las 3 primeras semanas. Se comienza el entrenamiento de propiocepción después de 3 semanas.

Se puede nadar después de la semana 6, montar en bicicleta después de la semana 12 y se fomenta correr progresivamente a partir de la semana 20.

6. Conclusión

En conclusión, se ha presentado una gran cantidad de pruebas que apoyan el trasplante de aloinjertos de menisco en rodillas doloridas en las que se ha practicado una meniscectomía, prestando atención a las indicaciones correctas. Se ha conseguido un alivio del dolor y una mejora de la función significativos en un porcentaje alto de pacientes. Parece que estas mejoras duran un tiempo prolongado en el 70% de los pacientes. Basándose sólo en la radiología y la IRM, un subconjunto de pacientes no muestra mayor degeneración de cartílago, lo que indica un efecto condroprotector potencial. Se considera un fallo básico

la falta de un grupo de control conservatizado en los estudios citados, lo que hace difícil establecer el verdadero efecto condroprotector de este tipo de tratamiento. Basándose en los resultados presentados, el trasplante de aloinjertos meniscales no debe seguir considerándose cirugía experimental al tratar rodillas doloridas en las que se ha practicado una meniscectomía.

7. Tablas

Tabla 1

Sistema de evaluación de lesiones de cartílago de la Sociedad internacional de regeneración de cartílago

| | |
|---------|---|
| Grado 0 | Normal |
| Grado 1 | Lesiones superficiales, flexibilidad, fisuras o roturas |
| Grado 2 | Lesiones, erosión o ulceración menor al 50% |
| Grado 3 | Defecto de grosor parcial mayor al 50% y menor del 100% |
| Grado 4 | Ulceración y exposición ósea |

8. Leyenda de figuras

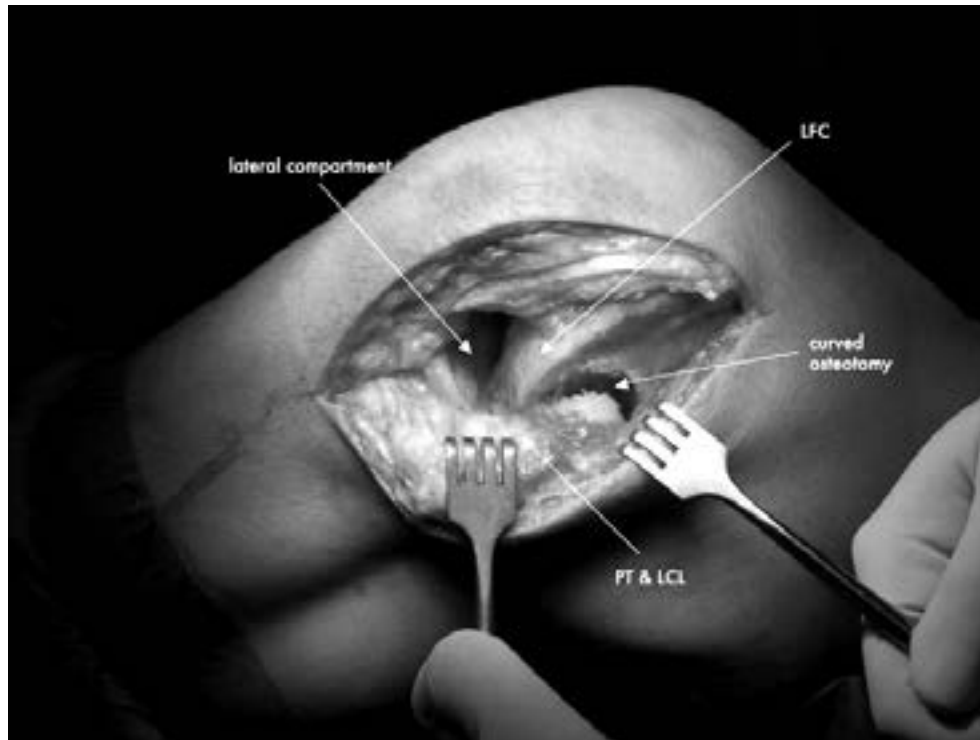


Figura 1

Trasplante abierto del aloinjerto meniscal. Para abrir más el espacio lateral, se separan el LCL y el PT con una osteotomía curvada en el lado femoral.

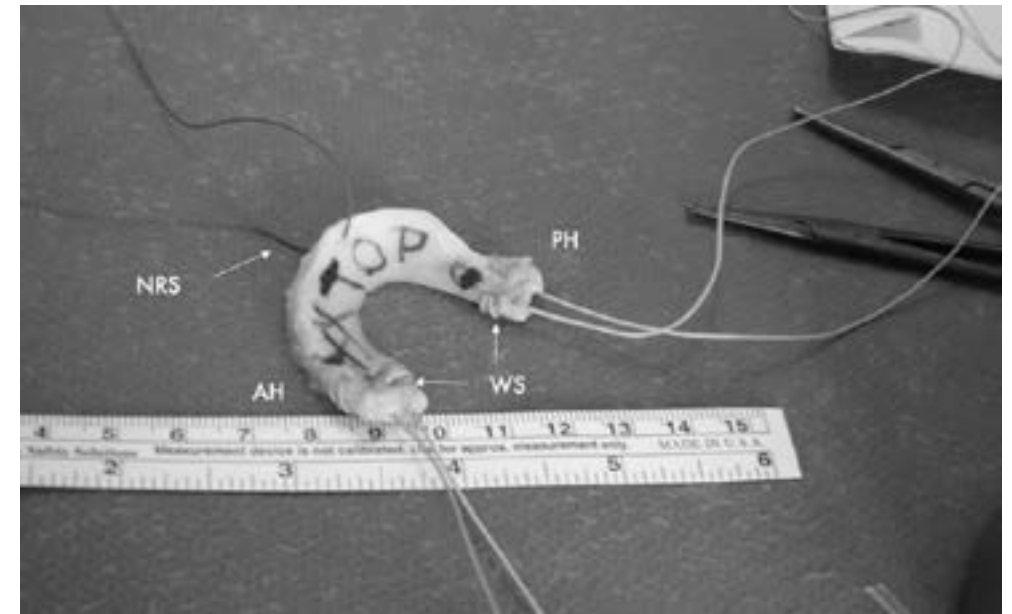


Figura 2

Aloinjerto meniscal lateral preparado para un trasplante meniscal artroscópico. Pespuntes de unión el el anillo interno y externo del cuerno anterior y posterior. Se coloca una sutura no reabsorbente vertical en la esquina posterolateral, justo en la parte anterior al hiato del TP.



Figura 3

Guía del LCA modificada con punta de bajo perfil. Esta guía se coloca en el cuerno posterior anatómico del menisco lateral, justo en la parte posterior al LCA.

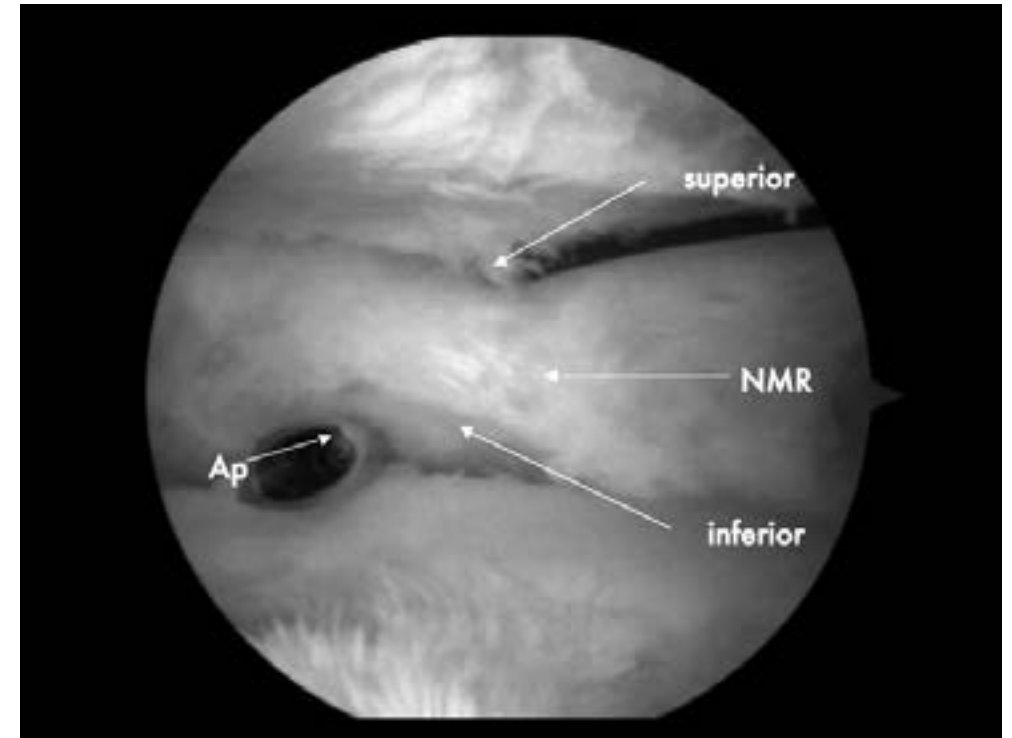


Figura 4

Se introduce dos veces un conductor de sutura (Acupass®Ap) desde el interior hacia fuera, justo en la parte anterior al LCL y el TP, y en la parte superior e inferior al anillo meniscal nativo.



Figura 5

Vista artroscopical del portal posteromedial utilizado en el trasplante de aloinjerto meniscal medial asistido con artroscopia. La guía básica del LCA se introduce a través de la incisura intercondílea en la inserción del cuerno posterior anatómico del menisco medial nativo.

9. Referencias

1. Cameron JC, Saha S (1997) Meniscal allograft transplantation for unicompartmental arthritis of the knee. *Clin Orthop* 337:164–171
2. Noyes FR, Barber-Westin SD (1995) Irradiated meniscus allografts in the human knee: a two to five year follow-up. *Orthop Trans* 19:417
3. Verdonk PCM, Demurie A, Almqvist KF, Veys EM, Verbruggen VR (2005) Transplantation of viable meniscal allograft: survivorship analysis and clinical outcome of one hundred cases. *J Bone Joint Surg Am* 87:715–724
4. Ryu RK, Dunbar VWH, Morse GG (2002) Meniscal allograft replacement: a 1-year to 6-year experience. *Arthroscopy* 18:989–994
5. Stone KR, Walgenbach AW, Turek TJ, Freyer A, Hill MD (2006) Meniscus allograft survival in patients with moderate to severe unicompartmental arthritis: a 2- to 7-year followup. *Arthroscopy* 22(5):469–478
6. Bhosale AM, Myint P, Roberts S, Menage J, Harrison P, Ashton B, Smith T, McCall I, Richardson JB (2007) Combined autologous chondrocyte implantation and allogenic meniscus transplantation: a biological knee replacement. *Knee* 14(5):361–368
7. Walker PS, Erkman MJ (1975) The role of the menisci in force transmission across the knee. *Clin Orthop* 109: 184–192
8. Johnson DL, Bealle D (1999) Meniscal allograft trans-plantation. *Clin Sports Med* 18:93–108
9. Cole BJ, Carter TR, Rodeo SA (2003) Allograft meniscal transplantation: background, techniques, and results. *Instr Course Lect* 52:383–396
10. Rodeo SA (2001) Meniscal allografts – where do we stand? *Am J Sports Med* 29:246–261

11. Cole BJ, Cohen B (2000) Chondral injuries of the knee. A contemporary view of cartilage restoration. *Orthop Spec Ed* 6:71–76
12. Rijk PC (2004) Meniscal allograft transplantation – part I: background, results, graft selection and preservation, and surgical considerations. *Arthroscopy* 20:728-743
13. Verdonk PC, Demurie A, Almqvist KF, Veys EM, Verbruggen G, Verdonk R. Transplantation of viable meniscal allograft. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am.* 2006 Mar;88:109-18. Review.
14. Goble EM, Verdonk R, Kohn D. Arthroscopic and open surgical techniques for meniscus replacement--meniscal allograft transplantation and tendon autograft transplantation. *Scand J Med Sci Sports.* 1999 Jun;9(3):168-76.
15. Messner K, Verdonk R. It is necessary to anchor the meniscal transplants with bone plugs? A mini-battle. *Scand J Med Sci Sports.* 1999 Jun;9(3):186-7.
16. Paletta GA Jr, Manning T, Snell E, Parker R, Bergfeld J. The effect of allograft meniscal replacement on intraarticular contact area and pressures in the human knee. A biomechanical study. *Am J Sports Med.* 1997;25:692-8.
17. Huang A, Hull ML, Howell SM. The level of compressive load affects conclusions from statistical analyses to determine whether a lateral meniscal autograft restores tibial contact pressure to normal: a study in human cadaveric knees. *J Orthop Res.* 2003;21:459-64.
18. Chen MI, Branch TP, Hutton WC. Is it important to secure the horns during lateral meniscal transplantation? A cadaveric study. *Arthroscopy.* 1996;12:174-81.
19. Alhalki MM, Howell SM, Hull ML. How three methods for fixing a medial meniscal autograft affect tibial contact mechanics. *Am J Sports Med.* 1999;27:320-8.

**LAUDATIO BY PROF. DR. PEDRO GUILLÉN GARCÍA
IN THE DOCTOR HONORIS CAUSA INVESTITURE
CEREMONY FOR PROFESSORS**

**DON JUAN CARLOS IZPISUA BELMONTE
AND DON RENÉ VERDONK**

Most Excellent President of the San Antonio Catholic University of Murcia,

His Eminence Card. Antonio Cañizares Llovera, Prefect of the Congregation for Divine Worship and the Discipline of the Sacraments

Most Excellent Rector Magnificus of this University,

Most Excellent and Most Reverend Lord Bishop of the Cartagena Diocese,

Most Excellent and Most Illustrious Academic, Ecclesiastic, Civil and Military Authorities.

Gathering of teaching, administration and services staff, students and all guests invited to this formal academic ceremony.

For the UCAM today is a day of great joy, and one that brings us special reason to celebrate, since with due ceremony it has the pleasure of appointing two prominent researchers: Don Juan Carlos Izpisua Belmonte and Don René Verdonk Doctor Honoris, Spanish and Belgian respectively. I would like to thank our President, Most Exc. Lord Don José Luis Mendoza and our Rector Magnificus, Lady Josefina García firstly for accepting the list of candidates we drew up at the Sports Trauma Department, and secondly for doing me the honour of inviting me to conduct their Laudatio.

I'm now going to take it upon myself to outline, in a few minutes, the professional lives of the Doctor Honoris Causa we have before us.

Studying and sharing the lives of two great men is no easy feat, nor is it a simple revision of a collection of anecdotes. It requires no less than revealing the characteristics of immortality.

Many thanks, President and Rector.

Following on from this, I will conduct a brief review of the professional lives of Don Juan Carlos Izpisua Belmonte and Don René Verdonk.

LAUDATIO BY PROFESSOR
DR. PEDRO GUILLEN GARCIA IN THE
DOCTOR HONORIS CAUSA INVESTITURE
CEREMONY PROFESSOR

DON RENÉ VERDONK

Dear Prof. René Verdonk, it is a great honour for me to be conducting the Laudatio in your Doctor Honoris Causa Investiture Ceremony at the Catholic University of San Antonio de Murcia.

DOCTOR HONORIS CAUSA is the Latin phrase that means “For his merits”, it is the most prestigious title at a University and is awarded as an Honour, in recognition of personal and professional achievements.

He was born in Ghent (Belgium), in 1946, when Europe was up in flames, and graduated in Medicine at the Ghent University in 1971, and he specialised in Orthopaedic Surgery and Traumatology in 1976. His Thesis was completed in 1992, at the Ghent University, on “Meniscal Graft Viability” where he was awarded the highest classification. Here we can already see what his main area will be in his career: meniscal graft and transplant, a field where he has the greatest global authority.

University Life:

At Ghent University, his home town, he has always specialised in Orthopaedic Surgery and Traumatology and at Ghent University Hospital he has had a glowing career, eventually becoming Head of the Orthopaedic and Traumatology Department. Also at Ghent University, in 1992, he reached the position of Professor of Orthopaedic Surgery and Traumatology and in October 2011 he was given the title Professor Emeritus.

It is in his professional activities where he stands out as one of the most distinguished figures in International Orthopaedic Surgery, notably as an exceptional surgeon with multiple surgical interventions and descriptions of

new operative techniques. He carried out the first meniscal transplants on the knee. His technique is followed by all orthopaedic surgeons. He has been invited to innumerable international congresses thanks to his knowledge and expertise and his publications are consulted by those who conduct studies in the area.

His investigation work is vastly extensive, especially in the field of meniscal transplants. After reading his long list of publications that we have included here, we can easily see that he is one of the best there is in Orthopaedic Surgery and Traumatology.

Some of his Clinical and Educational Activities and Theses are listed here:

A1 Publications

1. Interobserver reliability of the International Society of Arthroscopy, Knee Surgery and Orthopaedic Sports Medicine (ISAKOS) classification of meniscal tears Anderson AF, Irrgang DJ, Dunn W, Beaufils P, Cohen M, Cole BJ, Coolican M, Ferretti M, Glenn RE Jr, Johnson R, Neyret P, Ochi M, Panerella L, Siebold R, Spindler KP, Ait Si Selmi T, Verdonk P, Verdonk R, Yasuda K, Kowalchuk DA Am J Spo Med, 2011, Mar 16, Epub ahead of print
2. Twenty-six years of meniscal allograft transplantation: is it still experimental ? A meta-analysis of 44 trials.
Elattar M, Dhollander A, Verdonk R, Almqvist KF, Verdonk P
Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2011, 19, 147-157
3. Tissue ingrowth after implantation of a novel, biodegradable polyurethane scaffold for the treatment of partial meniscus lesions
Verdonk R, Verdonk P, Huysse W, Forsyth R, Heinrichs EL
Am J Sports Med, 2011, Mar 7 (Epub ahead of print)
4. Injury vol 44 supplm 1 jan 2013 ISSN 0020 1383
Indications an limits of Mneiscal Allograft Transplatation
R Verdonk P VolpiP Verdonk H Vander Bracht M van Laer K F
Almqvist S Van der Eecken E Propsero A Quaglia

A2 Publications

1. Repair of symptomatic cartilage lesions of the knee. The place of autologous chondrocyte implantation.
Vanlauwe J., Almqvist F., Bellemans J., Huskin J.P., Verdonk R., Victor J.
Acta Orthop. Belg., 2007, 73:145-158.
2. La transplantation méniscale.
Verdonk R., Verdonk P., Almqvist F.
e-Mémoires de l'Académie Nationale de Chirurgie, 2007, vol. 6, n° 3, 010-014.
3. Meniscus replacement: from allograft to tissue engineering.
Verdonk P.C.M., Van Laer M.E.E., Verdonk R.
Sportorthopädie-Sporttraumatologie, 2008, 24:78-82.

A3 Publications

1. Syndesmosis tibiofibularis pathologie.
G. Van Esbroeck, P. Burssens, R. Verdonk.
Vlaams T. Sportgeneeskunde en Sportwetenschappen, 1995, 64, 35-41.
2. Alternatieve behandelingswijzen voor meniscusletsels.
R. Verdonk
Vlaams T. Sportgeneeskunde en Sportwetenschappen, 1998, 77, 22-27.
3. Meniscustransplantatie.
R. Verdonk
Vlaams T. Sportgeneeskunde en Sportwetenschappen, 2001, 87, 13-18.

A4 Publications

1. Bio-artificiële implantatie in de orthopedie.
Verdonk R., Almqvist K.F., Verdonk P., Verstraete K.
Verhandelingen van de Koninklijke Academie voor Geneeskunde van België, 2004, 66: 269-274.

2. Bilateral traumatic simultaneous rupture of the medial collateral and anterior cruciate ligaments – A case report.

A. Schepens, J. Van Nuffel, E. Audenaert, R. Verdonk.

In: Folia Traumatologica Belgica 2005, Reynders P., De Baere T., Delloye C., Verdonk R., Broos P., Fabry G. (eds), 2005, 45-50.

3. Kraakbeen en meniscus, een intieme balans.

Verdonk R., Beaufils P., Almqvist F., Verdonk P.

Ortho Rheumato, 2007, 5:6-8.

B1 Author/Coauthor

Viable meniscal allografts.

R. Verdonk.

Thesis, Universiteit Gent, 1992.

B2 Chapters in Books

1. Meniscal Disorders

René Verdonk, Karl. F. Almqvist and Peter Verdonk

In: Orthopedic Sports Medicine: Principles and Practice,

Fabrizio Margheritini, Roberto Rossi (eds), Springer, 2010, 397- 416.

ISBN 978-88-470-1701-6

2. Meniscal healing enhancement techniques

Petronilia S., Verdonk R., Almqvist F., Verdonk P.

In : Meniscus repair, Beaufils P., Boisrenoult P., Pujol N. eds, Roma,

CIC Edizioni Internazionali 2011, 25-29

ISBN 978-88-7141-914-5

3. Long term outcomes of combines anterior cruciate ligament and allograft meniscus transplantation

In : Lesiones ligamentosas de la Rodilla

J A Hernandez Hermoso

J C Monllau Garcia , eds

Marge med books Valencia Spain

ISBN 978 84 1530 26 3

C3 Conferences

1. The biology of meniscal repair

P. Verdonk, R. Verdonk.

The 26th International Jerusalem Symposium on Sports Medicine, Jerusalem (Israel), 20-21 January 2010, Abstract book p. 26.

2. Long-term results of ACL repair and allografts

F, Almqvist, S. De Brabandere, P. Willaert, R. Verdonk

The 26th International Jerusalem Symposium on Sports Medicine, Jerusalem (Israel), 20-21 January 2010, Abstract book p. 53.

3. A novel meniscus scaffold for the treatment of meniscal tear or meniscal loss.

Verdonk P, Huysse W, Verstraete K, Verdonk R

International Bone-Tissue-Engineering Congress, Hamburg

(Germany), 07-09 November 2008. Tissue Engineering Part A, May 2009, 15:024-024.

Monography

Current opinion of orthopaedic surgeons on cartilage repair: the results of a global web-based survey.

R. Verdonk, M. Steinwachs, J. Vanlauwe, L. Engebretsen.

Trends in Cartilage Repair, September 2006.

As you can see, his CV is full of achievements that make him fully deserving of the great distinction of Doctor Honoris Causa of the UCAM.

The Prof. René Verdonk carried out assistential activity on a large scale and put the meniscal transplant into practice. He has always practised his professional work in his home town of Ghent and has been trying to find an alternative to meniscectomy to avoid secondary arthritis; “trying everything can be censured but knowing everything cannot”.

Orthopaedic Surgery, including osteosynthesis, prosthesis, arthroscopy and cell cultures, needed strokes of “good luck” but this only comes to those who search and work for it. In research, fortune or luck is rewarded to those who study hard, or rather, to the prepared mind; intuition already features here, an excellent example of something that cannot be learnt, the instinctive act, but that is still connected to, dependingly, learning.

I have seen, Distinguished Authorities that preside over us, those awarded today the title “Doctores Honoris Causa” of the UCAM pleasantly surprised by this beautiful, colourful and spectacular ceremony, and brilliant minds, like them, need to be prepared for surprises.

Congratulations, Prof. René Verdonk, and now we move on to expand on the topic of meniscal study:

Meniscal Repair and Replacement: Where do we stand?
Reparación Meniscal y Sustitución: ¿Dónde estamos?

LAUDATIO BY PROFESSOR
DR. PEDRO GUILLEN GARCIA IN THE
DOCTOR HONORIS CAUSA INVESTITURE
CEREMONY FOR RESEARCHING PROFESSOR

DON JUAN CARLOS IZPISUA BELMONTE

I feel truly honoured to have been chosen according to the norms of the University (UCAM) to be representing this highly-esteemed Educational Institution and to be conducting the Laudatio in this formal Doctor Honoris Causa Investiture Ceremony of the Researching Professor Juan Carlos Izpisua Belmonte.

As is customary, we will first give an overview of some parts of his biography and will then discuss his professional achievements and will conclude by giving him a warm welcome to the Board of Doctors at our University.

The life of Researching Professor Don Juan Carlos Izpisua Belmonte, born in Hellín (Albacete), has been hard but he has shown great determination and an unyielding will to exceed.

Married with two children, Luna and Elías. These three people are the most important part of his life.

I refuse to make any comparison to Don Juan Carlos Izpisua Belmonte, since from reading the following account which traces his early life and university studies, also going through his teenage years, we will straightaway get an understanding of the great character and enormous talent he has always been known for.

Juan Carlos’ father left home when he was three years old and he at this stage he already had two younger siblings aged 2 and 1. He spent 2 to 3 years at a school in Hellín but his mother, in need of an income, found work and so needed to send the three brothers away to a boarding school called Hogar Castillo de Olite, which is in Murcia, and he was there for 3-4 years.

In the school holidays their mother would take them along to the almond harvest, to sell turrón at the village fairs, and when Juan Carlos turned ten his mother took him out of school to take him to Benidorm with her to work.

He worked as a waiter in several bars and in one of them, a German bar, he also played the guitar and made sangria (the best sangría in Benidrom, according to Juan Carlos). Near to the bar there was a hotel where he started to work as a porter and he spent many years there and it is where his life took a real turn. By the age of fourteen he is reading anything he can get his hands on, and all his colleagues realise he is highly intelligent. This is when the hotel manager encourages him to get his school certificate. He passes the exam and matriculates in the Altea institute to study for the secondary school certificate, attending evening classes to be able to work at reception during the day.

The hotel closed down for a year and he then starts going to daytime classes. It is here where he decides that studying is what he wants to do. His career starts here and since then it has not stopped for breath.

He goes to great lengths to get grants to finance his studies and he always tries to be the best to get his hands on the largest bursaries.

He was undecided over which degree to take and he decides to sign up for Medicine but the Faculty is closed the day he goes to Valencia, and the Faculty of Pharmacy (next to Medicine) is open and so he matriculates there instead.

Where he matriculated is of little importance, since his energy and determination to do something in life would have brought him success no matter what degree he studied. He was bursting with talent and desire to work! He received his degree with the highest honours in his year. He received a bursary –one of the many he had- to do a two-year PhD at the Royal College of Spain in Bologna (Italy) and then he went to Heidelberg (Germany) to carry out a postdoctoral study.

A big football fan, he played defence in the Benidorm team all the years he lived there and they signed him up when seeing him play in the street. He also played a while for a team in Hércules de Alicante but in the end he decided to dedicate himself to his studies instead. If he hadn't put his studies first, today he would be a fantastic trainer in the first division thanks to his great ability at managing a team.

Don Juan Carlos Izpisua Belmonte has made great achievements in his investigation work and in this respect his life is one of tasks that have been completed with success, and I want to express my great joy and delight and I want to make it known by everyone.

Since he was a young Pharmacy student at Valencia University he showed a great vocation, an unconditional lover of innovation, which has allowed him to jump across not only research services, but also countries and continents (Spain, Italy, Germany, the United Kingdom and the USA).

After receiving in 1987 a Doctorate from Valencia University (Spain) and Bologna University (Italy), he spends a time as a post-doctorate at the Universities of Oxford and Cambridge (England), and then Juan Carlos Izpisua Belmonte undertakes another research placement this time in Heidelberg (Germany). Following on from this, he crosses the Atlantic to work at UCLA, Los Angeles (USA), and in 1993 he is contracted by the Salk Institute for Biological Studies in La Jolla, California, and is currently a professor at the “Gene Expression Laboratories”.

Between 2005 and 2013 he was also the Director of the Centre of Regenerative Medicine of Barcelona (Spain).

Distinguished Authorities, Ladies and Gentlemen, we find before us a researcher in Capital Letters, a professional researcher who fully devotes himself to this task.

In his investigation work he has attained the highest research position in the world today. Head of Research of the Cellular and Genetic Branch of La Jolla, San Diego, California, his department comprises a winner of

the Noble Prize in Medicine: Roger Guillemin. Here he is making great progress in Regenerative Medicine and in Cellular Reprogramming. He will talk about this subject in his speech, and he is the leading global figure on it.

He is in charge of a large research department in La Jolla, California, with great resources at his disposal, since here it is well understood that any country not investing in research declines. In his research work he dedicates so much conviction, knowledge and determination that he attracts many students who want to work in research. Yes, his example attracts and his word convinces.

Publications, Books, Conferences and Distinctions

In this section, impressive in every respect, about Don Juan Carlos Izpisua Belmonte, we are going to provide an overview:

- He had published over 350 articles in internationally-recognised influential journals (Nature Science...)
- He has received many important awards:
 - William Clinton Presidential Award
 - Pew Scholar Award
 - National Science Foundation Creativity Award
 - American Heart Association Established Investigator Award
 - Roger Guillemin Nobel Chair
 - IESS Juan Carlos Izpisua Belmonte de Hellín

In biomedical research we extract intimate mechanisms from the way tissues work and we then come up with ways of correcting the damaged cells or of curing illnesses. In traditional investigation we like to say that the “patient is equidistant to the medical treatment and the researcher”. Our Don Juan Carlos Izpisua Belmonte is fighting to give his research practical applications, this means making research work profitable.

The researcher as a navigator, first discovers and then colonises. This is the same as saying that first what’s new, what’s original is exposed and then guidelines are established for the practical application.

I felt like “AN IGNORANT PERSON IN A SHORT TOGA” like those who would go around alert, anxious and busy learning in hospitals, books and congresses (overcoming distances) whilst writing the Laudatio of this great Spanish Researcher.

His brief CV, that we’ve presented, shows his important publications, presence at congresses, conferences and distinctions achieved throughout his successful career.

Alongside his great intellectual capacity, the professor-researcher has a vast work capacity and achieves excellence within this.

DOCTOR HONORIS CAUSA is the Latin phrase that means “For his merits”, it is the most prestigious title at a University and is awarded as an Honour, in recognition of personal and professional achievements.

The subject of his talk is “Stem Cells, Cellular Reprogramming and Regenerative Medicine: Reality or Science Fiction?”

I will conclude by pointing out that after many scientific projects, now his main goal is investigating the development of new molecules and specific genes to treat illnesses that affect all humanity.

In view of everything that has been said and in recognition of their achievements, I recommend Doctors René Verdonk (Belgium) and Juan Carlos Izpisua Belmonte to be awarded the title of “Doctor Honoris Causa” of the San Antonio Catholic University of Murcia.

“His de causis, peto gradum, Doctori Honoris Causa Dominis Juan Carlos Izpisua Belmonte et René Berdonk”.

**STEM CELLS, REGENERATIVE MEDICINE
AND CELLULAR REPROGRAMMING:
FACT OR SCIENCE FICTION?**

Dr. D. Juan Carlos Izpisua Belmonte

Profesor-Investigador del Laboratorio de Expresión Génica del Instituto
Salk de Estudios Biológicos de La Jolla (California, EE.UU.)

en su Investidura como Doctor Honoris Causa
por la Universidad Católica San Antonio de Murcia

1. Introduction

1.1. Generation, regeneration and cellular plasticity: *an historical overview*

In the advent of the 21st century we might not yet be driving flying cars or traveling to the moon to visit a shopping mall but we have made significant progress toward other dreams, which, though perhaps not as fantastic, touch everyone's lives. Probably the best example of how technology has changed our lives is the continuous and even abusive use of information networks, in particular the Internet. Yet, technological advancements are not only the results of cutting-edge research. Importantly, the fruitful moment the medical field is currently experiencing, as well as the promising future we have in our hands, implies that some ideas take time to develop; sometimes they are rapidly accepted and other times they are implemented over a period of years in order to break an established scientific dogma. Certainly dogmatic science is a profound part of our current knowledge and perhaps it would not have been possible to dream what we dream without the strong historical influence the government, changing politics and religion had over our research. Could anyone imagine bringing the concept of stem cells to Lamarck, Linnaeus or even Galileo? Yet the idea has been subjacent in the mind of not only prominent scientists of a relatively modern age but further back in time to the impressive era of Greeks, Romans and Egyptians where knowledge was in the hands of philosophers and erudite people. In Greek mythology Prometheus was tied with the concept of regeneration and its implications. Chained to a rock in the Caucasus, his liver would be eaten every night by the eagles just to regenerate the coming day, implying the underlying concept of his immortality. As a matter of fact, traditional science was strongly based on observation and serendipity. With regeneration being perhaps one of the most amazing demonstrations of nature's power that one could observe, it is not difficult to imagine our ancestors wondering, if some animals are able to regenerate limbs, why not humans? In the early 18th century René-Antoine Ferchault de Reaumur conducted the first scientific work on the subject by demonstrating and describing regeneration of crayfish limbs and claws. Under the influence of this work Abraham Trembley went on studying regeneration by observing polyps. His work demonstrated the regenerative capacities of freshwater polyps by continuously cutting the animal into pieces. His observation led

to the discovery that polyps can regenerate entire individuals and form multi-headed polyps, termed Hydra in honor of the mythological figure. In the late 1760s, the Italian Lazzaro Spallanzani focused his studies on the regeneration potential of vertebrates and invertebrates. His work, published in 1768, describes the regeneration of tails, limbs and jaws of salamanders. Furthermore, he discussed the capacity of frog and toad tadpoles to regenerate their tails, as well as the ability of slugs and snails to regenerate their horns and heads. He also confirmed previous observations made by Charles Bonnet on the regenerative capacity of earthworms. Certainly regeneration fascinated, and still fascinates, a number of philosophers, naturalists and scientists; however it was not until relatively recently that empirical observations on the basics of cell biology and the subjacent potential of stem cells started to be understood.

1.2. The birth of stem cell research

So what are stem cells? Stem cells are defined from the embryological point of view as the cells that are able to generate an entire multicellular organism. Perhaps the concept itself could be interpreted as simple and obvious due to observation but it took more than 30 years to actually define stem cell identity and create reliable experimental conditions for the birth of stem cell research. In animal development, the zygote could be considered the initial totipotent cell. The zygote, a fertilized egg, is able to generate all cell lineages of the embryo, fetus and adult, including extra-embryonic tissue. It makes sense then to assume that if a whole organism can develop from a single cell, such a cell has the capacity to generate every possible tissue. Yet, the answer to the question of whether a population of self-renewing pluripotent cells remained has been elusive for decades. Indeed, the traditional belief of directional differentiation into specialized tissues is better exemplified by the Waddington landscape (Waddington, 1957). In such a hierarchical situation, the initial totipotent cell progressively loses its competence through consecutive steps of specification and differentiation. Thus, stepwise development implies the generation of pluripotent cells, able to generate every tissue of an adult organism, multipotent cells with the capacity to generate a few different cellular lineages but not all and unipotent cells, able to generate only one specialized cell type. As a matter of fact, both the traditional interest by developmental biologists and philosophers in regeneration, as well as the

initial work on stem cell identification, were somehow independent of each other. Even though regeneration by itself represented one of the most notorious scientific human questions, the stem cell field did not turn back to those studies at its inception. Indeed, the stem cell field shares its origins more with the oncological field than any other scientific subject of study. Currently, none of these fields seem independent and all of them share strong connections based on two major properties, the capacity for self-renewal and the ability to differentiate into a number of cell lineages. Now, combine the previous discussion about the elusive concept of remaining pluripotent cells in the adult organism with the observations on regeneration in vertebrates and invertebrates. In contemporary science it is somehow “easy” to make the connection and understand that if animals are able to regenerate organs or tissues up to some extent, there must be a population of cells with the potential to generate all those different specialized cell types, thus by definition historic work on regeneration was actually looking at stem cell activity. However, things are somehow not as easy as depicted here, and current knowledge will most likely argue against such a minimalistic concept. As a matter of fact, the capacity to regenerate does not simply involve an endogenous pool of resident cells, stem cells, with the ability to differentiate into a number of tissues but also, as we will further discuss later on, a number of different processes can actually take place. These processes are better illustrated by looking at the Waddington landscape. As discussed above, the landscape describes how “stem cells” lose their potency to differentiate into other tissue; however the occurrence of transversal shortcuts, namely lineage conversion/transdifferentiation/transdetermination, have been described recently (Graf and Enver, 2009). Additionally, differentiated cells can under certain circumstances “revert” their differentiated state to a situation in which cellular proliferation and the ability to generate a limited range of cellular types is obtained (Jopling et al., 2010). Once again, a look back in history proves that such concepts are perhaps not as novel as we thought. Thomas Hunt Morgan was not only a pragmatic scientist but also a fantastic observer. It is noteworthy that his capacity for observation brought Morgan to “catch” the first *Drosophila* white mutant when it flew through his window and breed it until mutant strains were obtained, thus launching genetics into a frenetic race that put in place the basis of modern biological sciences. Yet, legend has it that genetics was Morgan’s “second love”, following regeneration. Indeed, Morgan

was the first one to implement the term Morphallaxis and epimorphosis in order to define two different types of regeneration: that which occurs in the absence of active cellular proliferation and that which involves massive cellular proliferation. Yet, regeneration seemed to represent an unresolvable problem, an issue that led Morgan to abandon his interest in regeneration and dedicate his time to solving the “easier” question of heredity. Perhaps Morgan would have enjoyed and maybe even shed clarifying light on the discoveries that came soon after his death. In 1954, nine years after Morgan passed away, Stevens and Little described for the first time the spontaneous formation of testicular teratomas in inbred mice as well as the generation of such tumors by transplantation of primordial germ cells and early embryos, that is the transplantation of pluripotent cells (Stevens and Little, 1954). It didn’t take long for the initial report by Stevens and Little to be translated into the first generation of 3D structures with the capacity of being passaged in culture, the generation of ascite forms containing embryoid bodies in 1959 by Pierce and Dixon (Pierce and Dixon, 1959). Somehow, unknowingly, Pierce and Dixon described for the first time a population of cells with self-renewal capacity, the first fundamental criteria for definition of stem cells. Shortly after, Pierce and others were able to demonstrate the differentiation capacity of embryoid bodies in culture (Pierce and Verney, 1961; Pierce et al., 1960). Thus, establishing the second fundamental property shared by stem and cancer cells, the capacity for differentiation into a number of different cellular lineages. Whereas the differentiation process was a complete mystery, it was soon postulated that its mechanism could be analogous to embryo morphogenesis. Later on, Pierce and Kleinsmith described that individualized embryoid body cells were able to generate teratocarcinoma once injected *in vivo* (Kleinsmith and Pierce, 1964). That finding set the precedent and convincingly demonstrated the presence of pluripotent cells in the mass of the tumor. Accordingly, teratoma-derived cells with the capacity to self-renew as well as to differentiate into a number of different tissues were called embryonal carcinoma (EC). In 1970, two independent studies demonstrated the possibility to isolate and establish clonal cellular cultures from embryoid bodies (Kahan and Ephrussi, 1970; Rosenthal et al., 1970). Clonality by itself represented the proof-of-principle that pluripotent cells were present in the embryoid body rather than pre-committed cell populations due to the fact that the entire process could take place *in vitro*. The final proof of pluripotency was the transplantation into

animals and subsequent teratoma formation, a test still being employed in modern reprogramming studies to demonstrate pluripotency, as thoroughly discussed later in this chapter. In addition to being demonstrated in clonal cultures pluripotency was also observed as a general tendency of decreasing differentiated areas in late cultures. Indeed, these seminal studies were based on cultures that were originally established from tumor lines that were passaged extensively. Accordingly, it was soon postulated that the differentiation capacity of clonal cultures depended on passage number as well as time in culture. Fortuitous discovery led to the implementation of co-culture approaches in which irradiated chicken fibroblasts were used as feeder layer (Martin and Evans, 1974). Interestingly, the use of such feeders led to the classification of two different cellular types observed upon culture of teratomas, cells with epithelioid morphology were termed “E” cells, whereas small and rapidly proliferating cells were defined as “C” cells. Yet, at that time, it was not clear whether E cells were cellular derivatives resulting from C cell differentiation or if, on the other hand, such different populations pre-existed in the teratoma mass. A breakthrough discovery was reported by Martin and Evans in 1975 when they described the ability to induce directed differentiation of *in vitro* formed Embryoid Bodies (Martin and Evans, 1975a, 1975b). Interestingly, the authors state in their work several things that are still well accepted today. In fact, the very first line of their work states: “Mouse teratocarcinomas are a useful alternative to embryos for the study of mammalian cell determination (the process by which multipotential cells become committed to a particular developmental pathway), as well as for the study of subsequent terminal differentiation”. Not only were Martin and Evans able to establish differentiation conditions for the generation of embryoid bodies *in vitro* but also demonstrated the use of feeder layers for the generation of homogenous populations contrary with the mixture of E and C cells previously described as well as maintenance of cell viability. In this seminal work, differentiated embryoid bodies *in vitro* were able to generate a number of different tissues including cell types present in the three germ layers such as beating muscular cells and nerve processes as well as a number of other specialized cell types. Furthermore, the authors demonstrated the morphological differences present when nullipotent cells were induced to form 3D structures as compared to teratoma cells. Nullipotent cells were found to lack an endodermal layer, thus resulting in a smooth outer layer and

lack of potential for differentiation into any cellular derivative. Additionally, the authors found a general tendency for the cells to differentiate once feeders were removed and cells were fed with media. By that time, an independent study by Janet Rossant demonstrated the formation of an extraembryonic endodermal layer when cells from the inner cell mass (ICM) were isolated from the mouse embryo (Rossant, 1975). Thus, the authors concluded that *in vitro* differentiation of teratocarcinoma cells could serve to study the events of cell determination and differentiation, and that differentiation of EC cells follows normal embryonal development (Martin and Evans, 1975). Yet, EC cells were derived from teratocarcinoma and their malignancy a demonstrated fact, thus differentiation of EC cells and its parallelism with normal embryonic development had to be further demonstrated. As usual in science, the first demonstration of the developmental potential of EC cells didn't take long to occur. A number of studies evaluated the capacity of ICM cells to contribute to chimeric animals upon blastocyst transfer, yet those cells were still derived from normal embryos and the only study speculating the possibility of EC cells contributing to chimeric animals was based on *in vivo* generated embryoid bodies with limited success (Brinster, 1974). Two independent studies published in 1975 further clarified this issue and demonstrated chimera formation upon injection of EC cells, yet the generated animals showed a predisposition for tumor formation either upon birth or during life (Papaioannou et al., 1975; Mintz and Illmensee, 1975). Most importantly, chimeric contribution to the germline was not observed, thus ruling out that EC cells were fully identical to embryonal cells. This is perhaps where cancer and stem cells started diverging from each other. EC cells were teratocarcinoma-derived cells with the capacity to form secondary tumors upon retransplantation, furthermore, EC cells did show aberrant karyotype, a feature that might have explained their null contribution to the germline in the chimeric animals. Yet, the notion that EC cells were extremely similar to early embryonal cells rapidly grew during the early 70s. One of the major areas supporting this notion was the discovery of specific surface antigens for primitive undifferentiated EC cells. The work by Artzt and collaborators published in 1973 beautifully exemplifies and addresses these similarities (Artzt et al., 1973). Two underlying hypotheses were tested by the authors: first, as they elegantly explained in their introduction, "early-embryo cells may be expected to possess some specific antigens that are involved in development

and disappear later from the organism. These antigens should therefore evoke a specific immune response in the syngeneic adult organism". And secondly, "if PTC cells possess such determinants, hyperimmunization of syngeneic adult mice should elicit the formation of antibodies reacting, not only with PTC cells, but also with early-embryo cells". This approach demonstrated a satisfactory proof-of-principle that, indeed, undifferentiated teratocarcinoma cells, referred to as Primitive Teratocarcinoma Cells (PTC) by Artzt et al, do express stage-specific antigens leading to an immune response, that is, the generation of anti-sera recognizing surface molecules. The authors further explored the specificity of the generated anti-sera by testing its reactivity with other mouse cells including differentiated cells. Indeed, only male germ cells (the origin of most teratocarcinomas) and cleavage-stage embryos reacted against the PTC-specific antisera. Thus, EC cells presented common surface markers with embryonic and germ cells that were distinguishable from differentiated populations, a fact that was later corroborated and expanded by a number of other groups. Over the next few years the growing number of EC surface markers identified in common with embryonic cells led to the general understanding that ECs were indeed highly similar to ICM cells from the embryo. Based on such similarities, it did not take long to elucidate the actual origin of teratocarcinomas and accordingly, the EC cells. Teratocarcinomas were reported to derive from normal non-malignant cells, an observation that raised the possibility for culturing pluripotent cells without a tumor-forming step (Evans, 1981). Two independent studies described the generation of pluripotent lines by isolation of embryonal cells (Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981). Interestingly, even though the paper by Kaufman et al was published in Nature earlier, it was the work by Gail Martin, using EC conditioned media, that was the first to refer to these pluripotent cells as Embryonic Stem Cells (ES). Those cells bear all the previously observed characteristics of EC cells and demonstrated differentiation capacity. Furthermore, the pluripotent lines generated possessed normal karyotype. Considering that EC cells with aberrant karyotype were unable to contribute to the germ line, thus impeding genetic manipulation, the generation of pluripotent lines in the absence of genomic aberrations opened the possibility for the generation of chimeric animals with germ line chimerism. It took about three years until Bradley and collaborators described for the first time, successful generation of germ line chimeric

animals (Bradley et al., 1984), a report followed by intense activity due to its seemingly unlimited implications and possibilities. Generation of germ line chimeric animals implies the possibility for genetic manipulation of the animals, thus allowing for the creation of transgenic animals as well as the induction of random mutations. Retroviral vectors were the preferred option for these early studies on genetic manipulation (Robertson et al., 1986). Genetic engineering in the context of a cellular system following the normal developmental steps *in vitro* as well as the ability to generate transgenic animals opened up the possibility for modeling disease by simple means. Thus, ES cells were rapidly accepted as an alternative to the limited material available during normal embryo development as well as its time-dependent changes. On the other hand, culture of ES cells *in vitro* serves as an eternal reservoir for pluripotent cells which could then be induced to differentiated cells at the appropriate moments depending on the investigator necessities. While the rapid advancement done in the mouse system served to establish the notion of ES cells as pluripotent cells able to be propagated *in vitro* for an unlimited time as well as a perfect system to study development, the fact was that strong ethical concerns and the limited amount of material hampered direct translation into the human system. Nonetheless, a number of reports described the generation of pluripotent lines from non-human primates as an alternative to human embryo destruction for ES line generation (Thomson et al., 1995). Furthermore, the basic criteria used to distinguish EC cells from ES cells, i.e. the contribution of the pluripotent cells to the germ line in animal chimeras, was a strong impediment for the generation and characterization of human pluripotent lines. It was not until 1998 when the generation of Stem Cell lines from human blastocyst was first described (Thomson et al., 1998). In this historical report published in Science, Thomson and collaborators established the basic criteria for characterization of human pluripotent lines in the lack of human chimeras for ethical and practical reasons. Nevertheless, the criteria established by Thomson still apply and consist of three basic features of pluripotency: 1) derivation of the cells from the pre-implantation or peri-implantation embryo, 2) prolonged undifferentiated proliferation and 3) the capacity to differentiate into derivatives of the three germ layers *in vitro* even upon prolonged culture. The authors of this work used cleavage stage human embryos produced by *in vitro* fertilization and isolated the ICM upon culture. The resulting isolated cells were comparable to other non-

human primate ES lines previously established and fulfill all the pre-established criteria for pluripotency. Interestingly, this work demonstrated species-dependent differences in the pluripotent ES lines, thus establishing human ES cells as the most reliable method for studying human development contrary to the mouse system. Accordingly, the generated lines all expressed markers of pluripotency such as SSEA3/4, Tra1-60, Tra1-81 and stained strongly for alkaline phosphatase, similar to human EC cells. Yet, both human EC cells and human ES cells failed to express SSEA1, the first stem cell marker described for mouse cells.

2. The promises of pluripotency

Altogether, the fact that pluripotent stem cells can give rise to all cell types of an organism, along with the technical progress allowing for their isolation, bring to mind fantasies like the fountain of youth and eternal regeneration and represent one of the most promising scientific fields with clinical implications. In the following sub-chapter we will give an overview of which cells are pluripotent, the problems associated with their application and how they contribute to the development of the future medicine.

2.1. Achieving pluripotency in a culture dish: *state of the art*

2.1.1 Embryonal carcinoma cells:

Research on pluripotent stem cells finds its roots in the description of tumors, teratomas (benign) or teratocarcinomas (malignant), composed of haphazardly arranged adult tissues such as teeth, skin, hair, bone, muscle and others. The origin of these “monsters” (*teratos* in greek) was revealed by the description of a cell able to permanently self-renew while its daughter cells spontaneously differentiate into different cell types. The study of these tumors not only contributed to the identification and isolation of pluripotent cells but also established strong methodological bases for contemporary research on pluripotent cells (see **the birth of stem cell research** for an historical overview). In initial reports, several EC cell lines were clonally derived either from embryoid bodies, the cell aggregates resembling early

embryos which are found in the ascitic conversion of these tumors (Rosenthal et al., 1970; Kahan and Ephrussi, 1970) or from solid teratocarcinoma (Evans, 1972). Working on teratocarcinoma lines, Martin and Evans refined methods allowing for pluripotent stem cell culture, including embryonal carcinoma cell expansion on mitotically inactivated cell feeder layer and the formation of embryoid bodies *in vitro* (Martin and Evans, 1974). All in all, seminal works on murine and human EC cells led to the development of technologies resulting in the derivation of diploid pluripotent cells from blastocysts.

2.1.2. Embryonic stem cells:

At the initial stage of life, each individual is a single cell, which is the result of the fusion of both a male and a female gamete. Because they retain the capacity to generate both extra-embryonic and embryonic tissues, the fertilized egg and the first 4 cells produced by its division are classified as totipotent, i.e. able to generate a whole organism. Continuing its development through an exponential division process, a 64-cell developmental stage is reached at day 4-5 post-fertilization in humans; it's the so-called blastocyst stage. At this stage, a polarized inner cell mass (ICM) develops and the cells forming the ICM possess the potential to give rise to any of the three germ layers composing human tissues (endoderm, mesoderm and ectoderm). In 1981, Martin Evans and Matthew Kaufman reported for the first time the establishment in tissue culture of pluripotent cell lines isolated from *in vitro* cultures of mouse blastocysts (Evans and Kaufman, 1981). As previously mentioned, only a few months later, the term "Embryonic Stem Cells" (ES) was coined for these cells (Martin, 1981). However, it took 19 years until the first report on human ES cell (hES) isolation was published, laying the foundation of a wide new research area on human pluripotent stem cells (Thomson et al., 1998). Several other derivation methods of hES cells were further reported, all of them requiring the maintenance in culture, until blastocyst stage, of embryos produced by *in vitro* fertilization. Most of these methodologies include the isolation of ICM cells from the outer layer, i.e. trophoblast, by using immunosurgery, chemical, mechanical or laser-assisted procedures (Kim et al., 2005). Alternatively, a whole-embryo culture method was used to establish hES cells via the seeding of the entire blastocyst without its zona pellucida. The common denominator to these

techniques is that the cells are then seeded on feeder cells, usually mitotically inactivated mouse embryonic fibroblasts monolayer, or on dishes coated with extracellular matrix proteins supporting undifferentiated growth of hES cells. Curiously, human ES cells do not resemble mouse ES cells in all their properties (Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998) but, among common points, share an "indefinite" self-renewal capacity while retaining their ability to differentiate into all cell types of the organism.

One alternative to the use of embryos produced by assisted reproductive technologies for the derivation of ES cells is somatic cell nuclear transfer (SCNT) (Wilmut et al., 2002). Thanks to Dolly the sheep (Wilmut et al., 1997), this technique had an incredible impact on the public. Once transferred into an enucleated oocyte, the nucleus of a somatic cell is reprogrammed by egg cytoplasmic factors to become a fertilized egg. Thus, the egg is allowed to develop and reach the blastocyst stage, at which point ES cells can be isolated and maintained in culture. More recently, a report by Noggle et al. has demonstrated that human oocytes can reprogram somatic cells to pluripotent state (Noggle et al., 2011).

2.1.3 Embryonic germ cells:

Germ cells, in their ultimate form as haploid gametes (spermatozoa and ova), are at the origin of the genetic transmission initiating the generation of each organism. During development, germ cells arise from primordial germ cells (PGCs), taking their origin in the epiblast before settling down in the gonadal ridge. Although PGCs appear at a later developmental stage than the blastocyst, these cells resemble ES cells. When placed in ES cell culture conditions after their isolation from mouse (Matsui et al., 1992) or human (Shamblott et al., 1998) embryos, the embryonic germ cells (EGCs) display typical features of pluripotency including self-renewal, ability to give rise to cells of the three germ layers and to form embryoid bodies.

2.1.4 Induced pluripotent stem cells:

Whereas the concept of SCNT shed light on the possibility that changes governing differentiation can be reversed, the first report on induced

pluripotent stem cells (iPSCs) marked a radical change in our contemporary vision of pluripotent cells. In 2006, Takahashi and Yamanaka revealed to the world the ability to experimentally generate, mouse (Takahashi and Yamanaka, 2006) and later human (Takahashi et al., 2007), pluripotent stem cells without the need of embryonic material. Using a funnel strategy, they overexpressed in adult mouse fibroblasts 24 genes previously identified as playing pivotal roles in the maintenance of pluripotency in ES cells. By exploring multiple combinations and with a reductionist approach, they ended up with the identification of 4 transcription factors, namely Oct3/4, Sox2, c-Myc and Klf4, allowing the reversion of adult fibroblasts back to an ES-like cell phenotype when maintained in pluripotent culture conditions previously established (see above). This major breakthrough generated incredible excitement in the scientific community. Later on, the Thomson laboratory reported the possibility to reprogram somatic cells by replacing two of the “Yamanaka factors,” c-Myc and Klf4, by Nanog and Lin28 (Yu et al., 2007). Then, several laboratories reported that pluripotency could be achieved by using 3 (Nakagawa et al., 2008), 2 (Giorgetti et al., 2009) and even only one of these factors (Kim et al., 2009b), depending on the somatic cell type that was started with. The observation that Oct4 alone is able to revert neural stem cells back to an ES-like cell (Kim et al., 2009b), has revealed Oct4 as the core transcription factor for pluripotency. Since the initial reports describing iPSC generation by viral-based/integrative approaches, including the use of mono- and poly-cistronic vectors (Carey et al., 2009), laboratories worldwide rapidly raced to develop alternative technologies to avoid the integration of exogenous DNA into the host genome. To date, several integration-free reprogramming methods were described including: i) Cre-recombinase excisable viruses (Soldner et al., 2009); ii) non-integrating adenoviruses (Stadtfeld et al., 2008); iii) expression plasmids (Okita et al., 2008; Kaji et al., 2009); iv) piggyBac transposition (Woltjen et al., 2009); v) episomal vectors (Yu et al., 2009); vi) delivery of reprogramming proteins (Zhou et al., 2009; Kim et al., 2009a); vii) delivery of mRNAs (Warren et al., 2010). More recently, the possibility to reprogram somatic cells by overexpression of a specific cluster of miRNAs (miR-302/367) was reported (Anokye-Danso et al., 2011), raising the possibility of rapidly developing another integration-free reprogramming method.

Even though the number of reprogramming approaches is continuously growing, and several methodologies seem to have surpassed the initial efficiencies and time required for reprogramming, the fact is that even though extremely similar, ES cells and iPSCs present several differences (Phanstiel et al., 2011). Precise comparison of both pluripotent cell types led to the observation that even though global gene expression was highly correlated small differences in mRNA expression can be observed (Chin et al., 2009). Furthermore, the epigenetic profile of both cell types has been shown to be different and epigenetic memory, i.e. the maintenance of epigenetic marks from the somatic tissue of origin, has been reported for iPSCs (Kim et al., 2010; Polo et al., 2010).

2.2. The dark side of pluripotent stem cells: *slowing down therapeutic applications*

The truth is that iPSCs are not fully identical to ES cells. However scientists agree on the potential of such a source of pluripotent cells even in the presence of these differences. Indeed, the story of all pluripotent stem cells, and not only iPSCs, can be viewed as a roller coaster with its ups and downs reflecting the dichotomies associated with what defines their identity: their self-renewal and differentiation capacity. Considering this, in the following sections we will discuss the reasons why, despite the enormous hope behind their utilization, pluripotent stem cells still face problems which are slowing down their translation to the clinic.

2.2.1. *Ethical issues*

Until recently, one of the major problems related to the use of human pluripotent stem cells was more societal than technical. The need for embryonic material, and its consequent destruction for the isolation of embryonic stem cells (ES and EGCs), has been the source of disputes in both the political and religious arenas, as well as the media and the scientific community itself. Similarly, the ability to generate pluripotent cells by using SCNT technology has led to fear of the possibility of therapeutic cloning, in which human clones could eventually be utilized to cure the “original” individual. As such, strict regulatory laws regarding the use of embryonic-

and SCNT-derived ES cells have been established in a number of countries. Currently, thanks to the discovery of iPSC reprogramming, such concerns seem rather reduced and, new avenues are being paved for the application of pluripotent cells in the medical field.

2.2.2. *The pluripotency-associated cancer risks*

EC cells are a good introduction to the main remaining issue associated with the use of pluripotent cells. Indeed, genetic causality has been associated with the high incidence of spontaneous teratocarcinoma in a specific mouse strain (Stevens, 1973). This observation suggests that genetic mutations could be responsible for the maintenance of a quiescent pluripotent state that can later degenerate and lead to malignant tumor formation. Moreover, work in the cancer field has shown that mutation(s) in a particular set of genes, i.e. oncogenes and tumor suppressor genes, can be at the origin of tumor formation. Considering this, in spite of the hope raised by the use of pluripotent stem cells for therapeutic applications, there are serious safety issues. Thus, the tumorigenic potential associated with pluripotent cells strongly hampers the translation of discoveries to the clinic.

In 1995, the identification of genomic alterations in cultured hES cells caused a new major concern regarding the use of pluripotent cells and their derivatives for clinical perspectives (Maitra et al., 2005). In their study, Maitra and collaborators demonstrated that the maintenance of hES cells in culture leads to genomic alterations commonly observed in human cancers such as copy number variation (CNV), and epigenetic modifications. Such observations have suggested that the clonal expansion methodology commonly used for the maintenance of pluripotent cells in culture provides a means for the selection of mutants presenting advantageous features closely related to cancer cells. The hypothesis of culture-induced genomic instability was confirmed by the work of Allegrucci and collaborators in which they showed that hES cell lines inherit epigenetic changes in culture over time (Allegrucci et al., 2007). Importantly, they have shown that such epigenetic modifications usually arise early post-derivation and thus support the advantageous selection theory. Today, it is well established that hES cells share numerous cellular and molecular phenotypes with cancer

cells either in their untransformed state (diploidy) or after transformation in culture (aneuploidy) (Knoepfler, 2009; Blum and Benvenisty, 2009, 2008). Unfortunately, iPSCs are not the exception making the rule. Indeed the golden age of iPSCs was recently shaken when a series of studies, using a wide spectrum of genomic tools such as exome sequencing and single-nucleotide polymorphism (SNP) arrays, demonstrated that iPSCs bear mutations that were not present in the initial somatic cells (Gore et al., 2011). Noticeably, the Zhang laboratory identified, among 22 iPSC lines analyzed, an average of 5-point mutations in protein-coding regions. More worrisome is the fact that most of these mutations (~50%) were identified in genes related to cancer. Importantly, this study ruled out the possibility that observed mutations were the consequence of integrative reprogramming strategies. Indeed, Gore et al. observed a similar pattern of mutations in iPSC generated from either viral (retro-/lenti-viruses) or non-viral (mRNA, episomal vector) reprogramming approaches. Similarly, the Loring laboratory has shown that a higher frequency of CNVs can be observed in hES and hiPSC (Laurent et al., 2011). Interestingly, the authors identified that deletions of tumor-suppressor genes are more prone to appear during the reprogramming process whereas hiPSC expansion, seems to support the duplication of oncogenes. Although different in concept, other reports have reinforced the idea that somatic cells and iPSCs per se, undergo a double selection process that discards cells presenting disadvantageous mutations for the profit of cells bearing mutations supporting their maintenance in an ES-like state. Further corroboration is needed to determine whether this is the actual case. Paralleling these studies, Lyster et al. have highlighted the differences on DNA methylation present between hES and hiPSCs (Lister et al., 2011). Of importance was the observation that aberrant epigenomic marks, termed Partially Methylated Domains (PMDs) were maintained in hiPSC lines and further transmitted to differentiated derivatives. All in all, the observed deregulation of imprinted genes due to culture conditions (ES, iPSC) and/or the reprogramming process per se can be associated with tumorigenesis as well as altered cell differentiation capacity and so, could provide adverse outcomes for pluripotent stem cell applications.

Furthermore, in addition to the risks associated with insertional mutagenesis and possible tumorigenic transformation of pluripotent cells or

their derivatives, contamination of differentiated cells with undifferentiated cells is another obstacle that needs to be addressed before translation to the clinic and regenerative medicine purposes can be achieved. To avoid this issue, strategies allowing the exclusion of remaining pluripotent cells from a pool of cells “ready for transplantation” are under intensive investigations. The development of differentiation protocols (see later) presents a dual interest in this context. First, it allows for the production of (pre)committed cells for further transplantation or drug testing assays. Second, if the differentiation efficiency reaches 100% it will allow for the complete elimination of pluripotent cells from the culture. To date, such a protocol is not available for any kind of cell type implying that the development of alternative strategies is required to purge residual pluripotent cells *in vitro* and/or *in vivo*. The standard procedures to abrogate remaining pluripotent cells post-differentiation rely on the use of antibodies recognizing specific cell surface markers and sorting procedures. Accordingly, negative or positive selection of pluripotent cells / differentiated cells can be performed prior to transplantation (Tang et al., 2011). Besides, studies have shown that a cytotoxic antibody recognizing podocalyxin-like protein-1 can kill hES cells (Choo et al., 2008; Tan et al., 2009). Despite the great interest of this antibody-based strategy, problems inherent to the use of antibodies such as the potential activation of downstream pathways or the induction of immune reaction post-transplantation have to be considered. Recently, a series of reports identified a specific glycoprotein pattern in pluripotent cells that could lead to the development of lectin binding strategies for the exclusion of pluripotent stem cells from a pool of differentiated cells (Toyoda et al., 2011; Wang et al., 2011). However, none of the current cell-sorting strategies is stringent enough and even though reduced in number, pluripotent cells remain in the sorted cell population. Moreover, cell sorting does not prevent the risk of spontaneous *in vivo* dedifferentiation and thus the development of alternative strategies is required. To date, the adaptation of suicide-gene technology, initially developed for treating cancer, to the research on pluripotent cells represents an active way of investigation (Schuldiner et al., 2003). The principle consists of the genetic introduction of suicide gene(s), usually located under the control of pluripotent specific promoter genes, in order to control the cell fate of pluripotent cells *in vitro* and *in vivo* without interfering with their pluripotency and self-renewal capacity (Naujok et

al., 2010). Suicide genes usually encode drug-sensitizing enzymes, such as the Thymidine kinase gene for the Ganciclovir, and respond to the drug by killing the cells in which they are expressed. Other technologies propose to interfere with genes that are essential in the maintenance of a pluripotent status, such as c-Myc, in order to force residual pluripotent cells to differentiate. Similarly, it has been proposed to interfere with teratoma-associated genes that are dispensable for mature tissues. Thus, it has been shown that ablation of survivin expression, via genetic or pharmacologic methods, induces apoptosis in hES cells (Blum et al., 2009).

All in all, whereas it remains to be proven that differentiated cells derived from pluripotent cells are prone to induce tumors once transplanted in adult tissues, the monitoring and strict control of pluripotent-derived cellular products will certainly be a prerequisite for medical applications.

2.2.3. *Pluripotent-associated immunogenicity*

The use of pluripotent-derived cells for clinical applications faces another hurdle when considering the development of cellular products suitable for transplantation. Beyond the need to establish the safety of pluripotent cells and their derivatives in terms of tumorigenicity, overcoming the immunological barriers associated to their transplantation is also challenging. Because of the ethical reasons previously discussed (i.e. therapeutic cloning), as well as the potential immune rejection of unmatched ES-derivative transplantation, much attention has focused on iPSCs, as well as alternative sources for regenerative medicine, such as adult stem-derived cells and lineage converted cells (see later sections). Theoretically, reprogramming of somatic cells into iPSCs offers the possibility for the generation of personalized cell types suitable for autologous transplantation. Nevertheless, a study from Zhao and collaborators recently demonstrated that the transplantation of undifferentiated iPSCs induced a T-cell-dependent immune response even when transplanted into a syngeneic animal (Zhao et al., 2011). To date, the origin of this immune response is not clear and could be the consequences of the epi- and genetic aberrations acquired during both the reprogramming process and their further maintenance in culture (see *The pluripotency-associated cancer risks*). Though immune rejection

upon transplantation of iPSCs was observed in syngeneic mouse models, it remains to be demonstrated whether iPS-derived differentiated cells will lead to the same response and even if, in the event of transplantation of pure differentiated populations, such cells can lead to tumor formation.

2.3. Pluripotent cells and differentiation: *raising hopes for the clinic*

Soon after their first isolation, pluripotent stem cells, based on their ability to virtually generate all cell types composing an adult organism, have offered the possibility to study human developmental biology in a culture dish. Reciprocally, knowledge acquired from developmental studies in other model systems has facilitated our understanding of lineage commitment. Beyond the use of pluripotent cells for revealing developmental processes, the possibility to reproducibly drive the differentiation of pluripotent stem cells towards a specific cell population represents a major hope for curing many diseases, whose origins are in a cellular deficiency or malfunction, and for which no efficient molecules have been found yet. As we will further discuss, the differentiation of pluripotent stem cells into a clinically relevant cell type, as well as the possibility for gene-correction of mutant genes, represent an alternative for personalized cell therapy, but also for the development of platforms useful for drug-screening and disease modeling.

2.3.1. Generation of clinically relevant cells in a culture dish

Although developmental mechanisms remain elusive, lessons learned from developmental studies allowed for a better comprehension of the mechanisms leading to the formation of a complex multicellular organism. Along this line, the importance of different signaling pathways regulating, maintaining and driving differentiation of pluripotent cells throughout development has been demonstrated (Young, 2011). Thus, the root of most *in vitro* differentiation protocols rely on the ability of extrinsic signals to be propagated through intracellular signal-transduction pathways leading to the regulation of specific genes controlling cell fate. Thus, factors identified as influencing germ layer induction in the embryo, such as the Wnt, Nodal, transforming growth factor- β (TGF- β), fibroblast growth factor

and bone morphogenic protein signaling pathways, have been successfully translated into *in vitro* differentiation protocols (Gadue et al., 2005; Murry and Keller, 2008). As one example, BMP signaling is clearly required to induce mesodermal cell populations, at least in the initial stage of differentiation. In general, differentiation protocols usually rely on one of the three following methods: i) the formation of floating embryoid bodies prior to differentiation; ii) a direct induction of pluripotent stem cells maintained on extracellular matrix protein; iii) the co-culture of pluripotent stem cells on stromal cell layers. Without being exhaustive, several examples can be discussed (one derived from each germ layer) for which reproducible differentiation protocols have been reported. Firstly, differentiation of pluripotent stem cells into neural phenotypes including neurons, oligodendrocytes and glial cells, is under constant investigation and insights gained from developmental biology have been exploited to control both the neuronal commitment of pluripotent cells as well as subsequent specification. Accordingly, the identification of the Notch, sonic hedgehog, the FGF and TGF- β families as well as Wnt signaling pathways as key players in the establishment of the neuroectoderm, neural progenitors and later terminally differentiated neural cells has been crucial (Aubert et al., 2002; Kubo et al., 2004). Consequently, it is now possible to derive functional cells, such as dopaminergic neurons (Perrier et al., 2004) or motor neurons (Wichterle et al., 2002), which present a high interest in pathologies like Parkinson's disease and Amyotrophic Lateral Sclerosis, respectively. Interestingly, not only has functionality of the generated neural cells been demonstrated *in vitro* but animal models have also demonstrated improvement after cell transplantation (Kim et al., 2002). Another cell population of high interest for the clinic includes cardiac cells. Upon heart failure, massive amounts of differentiated cardiomyocytes, as well as vascular cells, are lost in the injured area of the heart. Thus, derivation of substantial amounts of cells potentially able to replenish the heart could ideally be achieved by directed differentiation of pluripotent cells. Indeed, it has been demonstrated that cardiomyocytes transplantation contributes to heart function recovery in different animal models (Cai et al., 2007). The possibility of generating cells able to have spontaneous beating activity in culture was first reported by Doetschman and collaborators (Doetschman et al., 1985). Since then, further comprehension of these mechanisms allowed for the identification of BMP4 and activin as two important inducers for

cardiomyocyte differentiation after mesodermal induction (Laflamme et al., 2007; Yao et al., 2006). Originating from the endoderm, pancreatic β cells represent another exciting cell type for translational studies. Due to their capacity to produce insulin, transplantation of pancreatic β cells could be employed for the treatment of type I diabetes. Here again, the generation of pancreatic β cells relies on recapitulating, *in vitro*, the sequential activation of different signaling pathways involved in normal development of such a cell population. In 2006, D'Amour and collaborators brought evidence that a temporal series of growth factor-mediated signaling pathway modulations was able to mimic pancreatic development and pluripotent cells could be differentiated in cells resembling β cells (D'Amour et al., 2006). Further improvements to the protocol have shown that pluripotent-derived β cells were functional after transplantation into animal models (Jiang et al., 2007).

In summary, a growing number of differentiation protocols have been reported. However, to date, none of the reproducible protocols allow for the generation of pure populations. Moreover, a recent study has demonstrated clear transcriptional differences between pluripotent derivatives *in vitro* and their *in vivo* counterparts (Patterson et al., 2011). This study could explain why pluripotent-derived cells sometimes fail to recapitulate certain cellular functions found *in vivo*. As an example, pluripotent-derived hematopoietic stem cells produced by different methods rarely, or not reproducibly, contribute to the reconstitution of the hematopoietic system as compared to traditional bone marrow transplantation. With this in mind, efforts in developing efficient differentiation protocols suitable for further transplantation in human, i.e. xeno-free, as well as those leading to fully functional differentiated cells remain a major area of research before clinical translation can be envisaged. Besides, the number of cells required for transplantation is critical and so, it is important to scale-up the appropriate cultures in order to fulfill the cellular demands necessary for clinical application.

In summary, a number of concerns hamper translation of stem cell technologies into the clinic, including ethical concerns, risk of tumor formation and immune rejection, as well as the fact that the majority of cells differentiated from hPSCs appear functionally immature. Very recently an alternative approach, pioneered by Dr. Nakauchi and named interspecific blastocyst complementation, has been hailed as powerful in

vivo platform for generating functional organs from PSCs. Interspecific blastocyst complementation is based on empty “developmental niche” created by knocking out specific gene(s) critical for the natural development of particular organ and use xenogenic wild-type PSCs to colonize the vacant niche and generate desired cells/tissues/organs. Proper development of this methodology raises the possibility of harvesting transplantable human cells/tissues/organs from domestic animals.

3. Lineage conversion and plasticity: new kids for the future of regenerative medicine

Considering all the potential pitfalls iPS technology has to overcome in order to find its way to the clinic, the ideal technology for clinical translation will involve a short-time window in order to obtain the desired cell lineage, an efficient protocol of differentiation and complete abrogation of pluripotent states, as well as non-integrative approaches. Keeping this in mind, alternative reprogramming approaches bypassing reprogramming towards pluripotency have been described. As such, direct lineage conversion could represent a complementary approach to iPS technology. Indeed, both iPS technology, as well as lineage conversion, rely on the fact that lineage commitment depends on a well-defined set of transcription factors (TFs) (Graf and Enver, 2009). Specific TFs under control of upstream signaling pathways are then responsible to activate and maintain the correct genetic program ensuring cell identity (Scheper and Copray, 2009). Thus, similar to iPS reprogramming, modulation of specific TFs, as well as upstream signaling pathways regulating TF activity, has opened the possibility of direct conversion of one lineage into another one. Direct lineage conversion does not involve reversion towards a pluripotent state and thus generally shortens the time required for obtaining the desired cell types. Furthermore, absence of pluripotent stem cells during transplantation should, by definition, reduce cancer risk as terminally differentiated cells will not present self-renewal and differentiation capacity. Interestingly, the processes of lineage conversion can be distinguished into two major groups: firstly, those processes in which specific sets of TFs, characteristic of the target cell-type, are overexpressed in the initial cell source in order to change the genetic and epigenetic program

of the cells and force the expression of the programs defining target cell type identity. Davis and collaborators first described such an approach in 1987. Ectopic expression of MyoD in mouse fibroblasts allowed for the generation of myotubes (Davis et al., 1987). Conversion of fibroblasts into myotubes represented the “proof-of-principle” of cellular plasticity without reversion to a pluripotent state and further differentiation into a different lineage. Several other studies have demonstrated the possibility of exchanging cell-identity, by either introduction of a single (Kulesa et al., 1995; Laiosa et al., 2006) or a combination of TF(s) (Ieda et al., 2010; Vierbuchen et al., 2010; Pang et al., 2011; Ambasudhan et al., 2011; Caiazzo et al., 2011; Son et al., 2011), as well as by *in vivo* ablation of TF(s) (Nutt et al., 1999). On the other hand, a number of recent reports have pointed out the possibility for inducing a more general conversion by partial induction of plasticity without forcing the somatic cells all the way back to a pluripotent state. In such a situation, overexpression of pluripotency factors, such as Oct4, Sox2, KLF4 and c-Myc and/or perhaps additional combinations, could serve to push the cells to an “open” epigenetic state suitable for further manipulation by modulation of signaling pathways (Efe et al., 2011). Thus, coupling a partially de-differentiated plastic state, induced by pluripotency factors but without achieving full pluripotency, with defined media able to further drive re-differentiation can be employed for the direct conversion of certain somatic cells into different lineages (Efe et al., 2011; Kim et al., 2011; Szabo et al., 2010).

4. Multipotent adult stem cells: the alternative to pluripotency

4.1. Generalities

Going back to the landscape model described by Waddington, multipotent stem cells, progenitor cells with a more restricted differentiation potential, occupy a strategic place in regenerative medicine. Able to self-renew and to give rise to a limited number of differentiated cell types, multipotent stem cells play a central role in the maintenance of adult tissue homeostasis (Simons and Clevers, 2011). Present in defined microenvironments regulating their plastic properties, the so called “stem cell niches”, these quiescent cells

respond to extrinsic signals allowing them to maintain a stem cell pool while generating newly differentiated cells (Jones and Wagers, 2008). These cells are extremely promising for the development of new curative strategies, particularly because they overcome numerous of the caveats encountered with the use of pluripotent stem cells, thus facilitating their translation to the clinic. As a demonstration, multipotent stem cells can be directly derived from adult tissues, thereby abolishing the ethical concerns associated with ES and EG cells. Moreover, adult stem cells do not require specific *in vitro* manipulations that might lead to genetic mutations as the traditional methodologies employed for generating iPSCs might. Finally, and in certain conditions, autologous cell transplantation can be envisaged in order to avoid immune rejection. Paralleling the isolation of pluripotent stem cells from teratocarcinomas, pioneering experiments showing the hematopoietic reconstitution of irradiated mice after transplantation of adult bone marrow cells represented the beginnings of work on adult stem cells (Ford et al., 1956; Nowell et al., 1956; Makinodan, 1956). Suggesting the presence of a cell type within an adult niche able to generate different cell types and repopulate an injured tissue, this observation revolutionized the ancient vision of the human body, i.e. “labile, stable and perennial” (Giulio Bizzozero). Since then, progress has led to the identification and isolation of adult stem cells from several other adult tissues, including the skin, liver, muscles, different brain areas, spinal cord, nose, bone marrow, heart and so on. This diversity of tissues containing adult stem cells mirrors the diversity of adult stem cells that have been successfully isolated so far. Thus, and contrary to pluripotent stem cells, it is difficult to find a general consensus for characterization of adult stem cells, such as a specific set of markers, rendering their identification more complicated. Generally, based on the observation of proliferative cells inside a structure, the final test for a “real” adult stem cell resides in its capacity to give rise to all or at least a few of the appropriate cell types of the tissue from which they are isolated. To date, different families of adult stem cells have been identified, including neural stem cells, mesenchymal stem cells (later referred to as MSCs) or hematopoietic stem cells. Importantly, most of the methodologies allowing for the maintenance of adult stem/progenitor cells in culture and their differentiation into specific lineages are well established (see above). Moreover, a number of studies have outlined the efficacy of adult stem cells or their derivatives for the treatment of a wide variety of

experimental models of disease. Thus, the use of adult stem/progenitors cells for regenerative medicine usually relies on two different methods: i) the transplantation of adult stem/progenitors; ii) the transplantation of adult stem/progenitor derivatives. Overall, adult stem cells represent more than a hope for the development of regenerative therapies and are already used in clinics either routinely or in clinical trials. Thus, and contrary to pluripotent stem cells, it didn't take long to translate the first discovery of adult stem cells to the clinic as illustrated by bone marrow transplantation-based therapies (Little and Storb, 2002). To date, all adult stem cell types present an interest for the clinic but, among all of them, MSCs are probably the prime candidate for the future of regenerative medicine.

4.2. Mesenchymal stem cells: on the way to the clinic

Though Arnold Caplan coined the term "mesenchymal stem cells" in 1991 (Caplan, 1991), works from Alexander Friedenstein were the first to shed light on a second type of resident adult stem cell within the bone marrow niche (Friedenstein et al., 1970, 1976). Initially, the term MSC was associated with the general concept of multipotent stem cells, but was progressively adopted to describe mesenchymal stem cells. Yet, the literature seems to lack a general consensus in this regard and both terms can be found referring to the same population of cells. Regardless the nomenclature, MSCs were first described as able to generate fibrous and osseous tissues while retaining clonogenic properties and were known as "Colony-Forming Unit-Fibroblasts". Indeed, a fibroblastoid shape characterizes MSCs in culture and directed differentiation of MSCs led to the successful generation of a number of cell types, depending on the initial source tissue they were isolated from, including adipocytes, osteocytes, chondrocytes, myocytes, neurons, hepatocytes and cardiomyocytes. It is interesting to note that in addition to the bone marrow, MSCs have so far also been successfully derived from many other adult tissues including skeletal muscle, dermis, adipose tissue, trabecular bone, umbilical cord, synovial membrane, the circulatory system, pericyte, dental pulp, nose, amniotic fluid, the heart and so forth (Beyer Nardi and da Silva Meirelles, 2006). These multiple sources reflect, in a way, the heterogeneity observed inside the "MSC superfamily" and certain variability in their differentiation potential. Importantly, most

of these tissues are relatively accessible, thereby opening the possibility of using MSCs for autologous cell transplantation. That said, the use of MSCs for regenerative medicine is a growing field with several examples showing promising therapeutic potential (Uccelli et al., 2011). Additionally, several other studies have demonstrated that MSCs could also play a beneficial paracrine action for tissue repair through the secretion of bioactive molecules such as growth factors, cytokines and chemokines (Meirelles et al., 2009). Of note is the identification of MSC-mediated immunomodulation (Uccelli et al., 2008) and a specific tumor-oriented migration/incorporation (Dai et al., 2011). This raises the possibility of expanding the use of MSCs for the treatment of autoimmune diseases and cancer therapies, respectively. Indeed, promises raised by MSC transplantation are on the way to becoming a clinical reality when considering the growing number of MSC-related clinical trials. Of particular interest is the use of MSCs in cardiac injuries/diseases, bone/cartilage degenerative diseases and neurological and immunological applications either by transplantation directly into the tissue or via systemic circulation. Whereas the safety of MSC-based therapies has been proved in many different clinical trials, evidence of tissue regeneration after transplantation are quite limited and the results reported need further confirmation.

5. Gene editing and Disease modeling

The development of gene-editing technologies in combination with the generation of patient-specific iPSC represents a merge of both stem cell and traditional gene therapy fields. Patient-derived iPSCs bearing monogenic mutations responsible for disease development are suitable material for *in vitro* correction of the mutant gene and further re-transplantation of the corrected cells into the patient. Moreover, gene-targeting technologies in mouse ES cells have made enormous contribution to the understanding of gene function, animal development and disease pathologies. However, translating the success of gene targeting in mouse ES cells into human ES or iPSCs has been challenging. Random integration of transgenes, a common feature with most of the traditional reprogramming approaches, has been the predominant method for modifying the human genome in the past. However,

the drawbacks of this approach are increasingly recognized, including the potential for insertional mutagenesis leading to tumor formation. Although random integration of transgenes mediated by viral transduction or transposable elements still holds its value in many applications, thanks to its simplicity and effectiveness, the field has moved beyond it and is in need of more precise ways to modify the human genome. Indeed, a number of recent publications have reported the successful correction of genes bearing mutations responsible for disease (Li et al., 2011; Liu et al., 2011b; Soldner et al., 2011; Howden et al., 2011; Papapetrou et al., 2011). Thus, different technologies can be applied for the genetic restoration of wild-type gene copies, which in the context of a monogenic disease, ultimately leads to phenotypic recovery and function improvement. Thus, gene-correction, as opposed to traditional gene-therapy in which genetic complementation rather than actual correction of the mutant gene is exploited, leads to the splicing of the mutant gene and its replacement by homologous recombination-mediated insertion of the wild-type version of the gene. So far, a number of different technologies have been developed, each with hallmark advantages and disadvantages. Yet, the most common issues associated with gene-targeting can be generally summarized as follows: 1) low efficiencies, particularly in pluripotent cells and transcriptionally inactive loci; 2) off target effects manifested by high toxicity, high incidence of random integration and other mutagenic responses due to the targeting process itself. Perhaps one of the most extended technologies nowadays involves the use of Zinc Finger Nucleases (ZFN) (Hockemeyer et al., 2009; Soldner et al., 2011). Briefly, ZFN nucleases are engineered proteins recognizing specific sequences of the genome. Nuclease activity leads to the generation of Double Strand Breaks on the DNA (DSBs) which can be further repaired by two different endogenous mechanisms, homologous recombination, leading to the successful correction of the targeted gene, and non-homologous end-joining, an error-prone DNA-repair mechanism leading to the generation of mutations in the host genome. Several other technologies have been reported so far, including the use of Helper Dependent Adenoviruses (HDAdV) (Suzuki et al., 2008; Liu et al., 2011b), Bacterial artificial chromosomes (BAC) (Yang and Seed, 2003), Transcription Activator Like Effector Nucleases (TALENs) (Cermak et al., 2011), that together with the most recently developed CRISPR/Cas system, represent some of the

most promising approaches for efficient gene-editing. Of note is the fact that the broad applications of gene-editing technologies cover not only gene-correction but also the generation of precisely targeted reporter cell lines that are extremely valuable for studying normal differentiation processes and high throughput screens. Moreover, specific knock-in as well as knock-out of genes of interest in pluripotent cell lines represents an unmatched tool for molecular studies. In this regard, patient-derived iPSCs not only holds immense promise in terms of gene-correction and regenerative medicine but also allows for concise analysis of the molecular mechanisms leading to manifestation and progression of a specific disease. Disease modeling subsequently presents the possibility for *in vitro* drug discovery, testing and development of personalized therapies (Dimos et al., 2008; Marchetto et al., 2010; Liu et al., 2011a; Brennand et al., 2011). However, three major concerns regarding the use of iPSCs for disease modeling have to be taken into account prior to their broad application in drug discovery studies. Firstly, considering the accumulation of epi/genetic abnormalities during the reprogramming process, it is thought that patient-derived iPSCs might present abnormal functionality. In such a situation, genetic abnormalities leading to the development of disease might contribute and/or synergize to the defective reprogramming of somatic cells into iPSCs, a question not yet addressed, which might lead to the wrong interpretation of results. Secondly, two recent reports have pointed out important differences between ESCs and iPSCs in specific disease contexts (Urbach et al., 2010). Thirdly, the use of patient derived iPSCs bears, by definition, another important experimental limitation, the lack of appropriate control lines. Of relevance is the fact that reprogramming-associated epi/genetic defects, even though clustering in specific cancer-related pathways, seem to be random in terms of specific genes. Thus, the use of different iPSC lines, those derived from a diseased patient and those derived from healthy individuals might indeed bear a number of epi- and genetic differences leading to the wrong interpretation of the results during drug discovery and disease modeling studies. In such a case a novel approach could take advantage of the development of novel gene-editing technologies in order to manipulate “real” pluripotent cells, ES cells, and allow not for gene-correction but for the modification of the cells in the opposite direction, the generation of disease-specific ES cells (Soldner et al., 2011). In such a paradigm, generation of ES cells bearing mutant

genes responsible for disease might well represent a more reliable source of pluripotent cells to model disease as direct splicing of wild-type genes and knock-in of mutant genes in already pluripotent cells will bypass the reprogramming steps and all its associated “side-effects.” Along this line, bypassing the reprogramming steps by generation of disease-specific ES cells might short-cut the necessity for validation of patient-derived iPSC and the potential mis-conclusions that could arise from the use of a defective disease model *in vitro*.

6. Conclusions

The current knowledge on stem cells and their regulation has opened the possibility for the genetic manipulation of somatic cells by nuclear reprogramming. Nuclear reprogramming refers to reprogramming towards pluripotency, that is, the generation of cells with similar differentiation and self-renewal capacities as Embryonic Stem cells. As such, the generation of iPSCs can be expanded to the derivation of cells from patients bearing monogenic mutations responsible for disease and recapitulated *in vitro* upon differentiation into specific cell lineages. Thus, patient-specific iPSCs can be employed for disease modeling and drug development. Furthermore, the rapid expansion of the field has led to the general understanding that transcription factor-mediated reprogramming includes not only achieving pluripotency but also a number of other processes that can lead to the direct conversion of one cell type into a different one, the process of lineage conversion. As discussed in here, the possibility to generate every desired cell type *in vitro* presents the opportunity for restoration of any injury from lost tissue by cell replacement. Yet, a number of problems including genetic and epigenetic instability have been described and need to be addressed prior to translation into the clinic. Alternatively, the discovery of endogenous pools of multipotent progenitor cells presents the opportunity to directly use adult stem cells without further genetic modifications *in vitro*, thereby potentially leading to a more direct clinical translation as demonstrated by the overwhelming number of clinical trials currently ongoing. Finally, and considering that gene-editing technologies efficiently target both, pluripotent cells as well as adult stem cells, the possibility for gene-correction

followed by autologous transplantation could be employed for the actual cure of monogenic inherited diseases in patients. Thus, the combination of both gene-therapy and stem cell fields opens the possibility for an additional avenue of therapy.

7. References

- Allegrucci, C., Wu, Y. Z., Thurston, A., Denning, C. N., Priddle, H., Mummery, C. L., et al. (2007) Restriction landmark genome scanning identifies culture-induced DNA methylation instability in the human embryonic stem cell epigenome. *Human molecular genetics*,16(10), 1253–1268.
- Ambasudhan, R., Talantova, M., Coleman, R., Yuan, X., Zhu, S., Lipton, S. A., et al. (2011) Direct Reprogramming of Adult Human Fibroblasts to Functional Neurons under Defined Conditions. *Cell stem cell*,9(2), 113–118.
- Anokye-Danso, F., Trivedi, C. M., Jühr, D., Gupta, M., Cui, Z., Tian, Y., et al. (2011) Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell stem cell*, 8(4), 376–388.
- Artzt, K., Dubois, P., Bennett, D., Condamine, H., Babinet, C., and Jacob, F. (1973) Surface antigens common to mouse cleavage embryos and primitive teratocarcinoma cells in culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,70(10), 2988–2992.
- Aubert, J., Dunstan, H., Chambers, I., and Smith, A. (2002) Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. *Nature biotechnology*,20(12), 1240–1245.
- Beyer Nardi, N., and da Silva Meirelles, L. (2006) Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handbook of experimental pharmacology*, (174) 249–282.
- Blum, B., Bar-Nur, O., Golan-Lev, T., and Benvenisty, N. (2009) The anti-apoptotic gene survivin contributes to teratoma formation by human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*,27(3), 281–287.
- Blum, B., and Benvenisty, N. (2009) The tumorigenicity of diploid and aneuploid human pluripotent stem cells. *Cell cycle*,8(23), 3822–3830.

- Blum, B., and Benvenisty, N. (2008) The tumorigenicity of human embryonic stem cells. *Advances in cancer research*, *100*, 133–158.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., and Robertson, E. (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, *309*(5965), 255–256.
- Brennan, K. J., Simone, A., Jou, J., Gelboin-Burkhart, C., Tran, N., Sangar, S., et al. (2011) Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, *473*(7346), 221–225.
- Brinster, R. L. (1974) The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *The Journal of experimental medicine*, *140*(4), 1049–1056.
- Cai, J., Yi, F.F., Yang, X. C., Lin, G. S., Jiang, H., Wang, T., et al. (2007) Transplantation of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves cardiac function in infarcted rat hearts. *Cytotherapy*, *9*(3), 283–291.
- Caiazzo, M., Dell’anno, M. T., Dvoretzkova, E., Lazarevic, D., Taverna, S., Leo, D., et al. (2011) Direct generation of functional dopaminergic neurons from mouse and human fibroblasts. *Nature*, *476*(7359), 224–227.
- Caplan, A. I. (1991) Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, *9*(5), 641–650.
- Carey, B. W., Markoulaki, S., Hanna, J., Saha, K., Gao, Q., Mitalipova, M., et al. (2009) Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(13), 157–162.
- Cermak, T., Doyle, E. L., Christian, M., Wang, L., Zhang, Y., Schmidt, C., et al. (2011) Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic acids research*, *39*(12), e82.
- Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., et al. (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell stem cell*, *5*(1), 111–123.
- Choo, A. B., Tan, H. L., Ang, S. N., Fong, W. J., Chin, A., Lo, J., et al. (2008) Selection against undifferentiated human embryonic stem cells by a cytotoxic antibody recognizing podocalyxin-like protein-1. *Stem cells*, *26*(6), 1454–1463.
- Dai, L. J., Moniri, M. R., Zeng, Z.R., Zhou, J. X., Rayat, J., and Warnock, G. L. (2011) Potential implications of mesenchymal stem cells in cancer therapy. *Cancer letters*, *305*(1), 8–20.
- Davis, R. L., Weintraub, H., and Lassar, A. B. (1987) Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, *51*(6), 987–1000.
- Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., et al. (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science*, *321*(5893), 1218–1221.
- Doetschman, T. C., Eistetter, H., Katz, M., Schmidt, W., and Kemler, R. (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *Journal of embryology and experimental morphology*, *87*, 27–45.
- D’Amour, K. A., Bang, A. G., Eliazer, S., Kelly, O. G., Agulnick, A. D., Smart, N. G., et al. (2006) Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nature biotechnology*, *24*(11), 1392–1401.
- Efe, J. A., Hilcove, S., Kim, J., Zhou, H., Ouyang, K., Wang, G., et al. (2011) Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nature cell biology*, *13*(3), 215–222.
- Evans, M. (1981) Origin of mouse embryonal carcinoma cells and the possibility of their direct isolation into tissue culture. *Journal of reproduction and fertility*, *62*(2), 625–631.
- Evans, M. J. (1972) The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells. *Journal of embryology and experimental morphology*, *28*(1), 163–176.
- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, *292*(5819), 154–156.
- Ford, C.E., Hamerton, J. L., Barnes, D. W., and Loutit, J. F. (1956) Cytological identification of radiation-chimaeras. *Nature*, *177*(4506), 452–454.
- Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., and Lalykina, K. S. (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics*, *3*(4), 393–403.
- Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., and Kulagina, N. N. (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Experimental hematology*, *4*(5), 267–274.

- Gadue, P., Huber, T. L., Nostro, M. C., Kattman, S., and Keller, G. M. (2005) Germ layer induction from embryonic stem cells. *Experimental hematology*,**33**(9), 955–964.
- Giorgetti, A., Montserrat, N., Aasen, T., Gonzalez, F., Rodríguez-Pizà, I., Vassena, R., et al. (2009) Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell stem cell*,**5**(4), 353–357.
- Gore, A., Li, Z., Fung, H. L., Young, J. E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., et al. (2011) Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature*,**471**(7336), 63–67.
- Graf, T., and Enver, T. (2009) Forcing cells to change lineages. *Nature*,**462**(7273), 587–594.
- Hockemeyer, D., Soldner, F., Beard, C., Gao, Q., Mitalipova, M., DeKever, R. C., et al. (2009) Efficient targeting of expressed and silent genes in human ESCs and iPSCs using zinc-finger nucleases. *Nature biotechnology*,**27**(9), 851–857.
- Howden, S. E., Gore, A., Li, Z., Fung, H. L., Nisler, B. S., Nie, J., et al. (2011) Genetic correction and analysis of induced pluripotent stem cells from a patient with gyrate atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**108**(16), 6537–6542.
- Ieda, M., Fu, J. D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B. G., et al. (2010) Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*,**142**(3), 375–386.
- Jiang, W., Shi, Y., Zhao, D., Chen, S., Yong, J., Zhang, J., et al. (2007) In vitro derivation of functional insulin-producing cells from human embryonic stem cells. *Cell research*,**17**(4), 333–344.
- Jones, D. L., and Wagers, A. J. (2008) No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nature reviews. Molecular cell biology*,**9**(1), 11–21.
- Jopling, C., Sleep, E., Raya, M., Martí, M., Raya, A., and Belmonte, J. C. I. (2010) Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*,**464**(7288), 606–609.
- Kahan, B. W., and Ephrussi, B. (1970) Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *Journal of the National Cancer Institute*,**44**(5), 1015–1036.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., and Woltjen, K. (2009) Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*,**458**(7239), 771–775.
- Kim, D., Kim, C. H., Moon, J. I., Chung, Y. G., Chang, M. Y., Han, B. S., et al. (2009a) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell stem cell*,**4**(6), 472–476.
- Kim, H. S., Oh, S. K., Park, Y. B., Ahn, H. J., Sung, K. C., Kang, M. J., et al. (2005) Methods for derivation of human embryonic stem cells. *Stem cells*,**23**(9), 1228–1233.
- Kim, J. B., Sebastiano, V., Wu, G., Araúzo-Bravo, M. J., Sasse, P., Gentile, L., et al. (2009b) Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*,**136**(3), 411–419.
- Kim, J., Efe, J. A., Zhu, S., Talantova, M., Yuan, X., Wang, S., et al. (2011) Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**108**(19), 7838–7843.
- Kim, J. H., Auerbach, J. M., Rodríguez-Gómez, J. A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., et al. (2002) Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature*,**418**(6893), 50–56.
- Kim, K., Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., et al. (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*,**467**(7313), 285–290.
- Kleinsmith, L. J., and Pierce, G. B. (1964) Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer research*,**24**, 1544–1551.
- Knoepfler, P. S. (2009) Deconstructing stem cell tumorigenicity: a roadmap to safe regenerative medicine. *Stem cells*,**27**(5), 1050–1056.
- Kubo, A., Shinozaki, K., Shannon, J. M., Kouskoff, V., Kennedy, M., Woo, S., et al. (2004) Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture. *Development*,**131**(7), 1651–1662.
- Kulesa, H., Frampton, J., and Graf, T. (1995) GATA-1 reprograms avian myelomonocytic cell lines into eosinophils, thromboblats, and erythroblats. *Genes & development*,**9**(10), 1250–1262.
- Laflamme, M. A., Chen, K. Y., Naumova, A. V., Muskheli, V., Fugate, J. A., Dupras, S. K., et al. (2007) Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nature biotechnology*,**25**(9), 1015–1024.

- Laiosa, C. V., Stadtfeld, M., Xie, H., de Andres-Aguayo, L., and Graf, T. (2006) Reprogramming of committed T cell progenitors to macrophages and dendritic cells by C/EBP alpha and PU.1 transcription factors. *Immunity*,**25**(5), 731–744.
- Laurent, L. C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., et al. (2011) Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell stem cell*,**8**(1), 106–118.
- Li, H., Haurigot, V., Doyon, Y., Li, T., Wong, S. Y., Bhagwat, A. S., et al. (2011) In vivo genome editing restores haemostasis in a mouse model of haemophilia. *Nature*,**475**(7355), 217–221.
- Lister, R., Pelizzola, M., Kida, Y. S., Hawkins, R. D., Nery, J. R., Hon, G., et al. (2011) Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature*,**471**(7336), 68–73.
- Little, M. T., and Storb, R. (2002) History of haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature reviews. Cancer*,**2**(3), 231–238.
- Liu, G. H., Barkho, B. Z., Ruiz, S., Diep, D., Qu, J., Yang, S. L., et al. (2011a) Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Nature*,**472**(7342), 221–225.
- Liu, G. H., Suzuki, K., Qu, J., Sancho-Martinez, I., Yi, F., Li, et al. (2011b) Targeted Gene Correction of Laminopathy-Associated LMNA Mutations in Patient-Specific iPSCs. *Cell stem cell*,**8**(6), 688–694.
- Maitra, A., Arking, D. E., Shivapurkar, N., Ikeda, M., Stastny, V., Kassaei, K., et al. (2005) Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nature genetics*,**37**(10), 1099–1103.
- Makinodan, T. (1956) Circulating rat cells in lethally irradiated mice protected with rat bone marrow. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*,**92**(1), 174–179.
- Marchetto, M. C. N., Carromeu, C., Acab, A., Yu, D., Yeo, G. W., Mu, Y., et al. (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell*,**143**(4), 527–539.
- Martin, G. R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**78**(12), 7634–7638.
- Martin, G. R., and Evans, M. J. (1975a) Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**72**(4), 1441–1445.
- Martin, G. R., and Evans, M. J. (1975b) Multiple differentiation of clonal teratocarcinoma stem cells following embryoid body formation in vitro. *Cell*,**6**, 467–474.
- Martin, G. R., and Evans, M. J. (1974) The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell*,**2**(3), 163–172.
- Matsui, Y., Zsebo, K., and Hogan, B. L. (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*,**70**(5), 841–847.
- Meirelles, L. da S., Fontes, A. M., Covas, D. T., and Caplan, A. I. (2009) Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & growth factor reviews*,**20**(5-6), 419–427.
- Mintz, B., and Illmensee, K. (1975) Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**72**(9), 3585–3589.
- Murry, C. E., and Keller, G. (2008) Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*,**132**(4), 661–680.
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., et al. (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature biotechnology*,**26**(1), 101–106.
- Naujok, O., Kaldrack, J., Taivankhuu, T., Jörns, A., and Lenzen, S. (2010) Selective Removal of Undifferentiated Embryonic Stem Cells from Differentiation Cultures Through HSV1 Thymidine Kinase and Ganciclovir Treatment. *Stem Cell Reviews and Reports*,**6**(3), 450–461.
- Noggle, S., Fung, H. L., Gore, A., Martinez, H., Satriani, K. C., Prosser, R., et al. (2011) Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state. *Nature*,**478**(7367), 70–75.
- Nowell, P. C., Cole, L. J., Habermeyer, J. G., and Roan, P. L. (1956) Growth and continued function of rat marrow cells in x-irradiated mice. *Cancer research*,**16**(3), 258–261.

Nutt, S. L., Heavey, B., Rolink, A. G., and Busslinger, M. (1999) Commitment to the B-lymphoid lineage depends on the transcription factor Pax5. *Nature*,**401**(6753), 556–562.

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science*,**322**(5903), 949–953.

Pang, Z. P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D. R., Yang, T. Q., et al. (2011) Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*,**476**(7359), 220–223.

Papaioannou, V. E., McBurney, M. W., Gardner, R. L., and Evans, M. J. (1975) Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature*,**258**(5530), 70–73.

Papapetrou, E. P., Lee, G., Malani, N., Setty, M., Riviere, I., Tirunagari, L. M. S., et al. (2011) Genomic safe harbors permit high β -globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*,**29**(1), 73–78.

Patterson, M., Chan, D. N., Ha, I., Case, D., Cui, Y., Handel, B. V., et al. (2011) Defining the nature of human pluripotent stem cell progeny. *Cell research*

Perrier, A. L., Tabar, V., Barberi, T., Rubio, M. E., Bruses, J., Topf, N., et al. (2004) Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**101**(34), 12543–12548.

Phanstiel, D. H., Brumbaugh, J., Wenger, C. D., Tian, S., Probasco, M. D., Bailey, D. J., et al. (2011) Proteomic and phosphoproteomic comparison of human ES and iPS cells. *Nature Methods*,**8**(10), 821–827.

Pierce, G. B., Dixon, F. J., and Verney, E. L. (1960) Teratocarcinogenic and tissue-forming potentials of the cell types comprising neoplastic embryoid bodies. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*,**9**, 583–602.

Pierce, G. B., and Dixon, F. J. (1959) Testicular teratomas. II. Teratocarcinoma as an ascitic tumor. *Cancer*,**12**(3), 584–589.

Pierce, G. B., and Verney, E. L. (1961) An in vitro and in vivo study of differentiation in teratocarcinomas. *Cancer*,**14**, 1017–1029.

Polo, J. M., Liu, S., Figueroa, M. E., Kulalert, W., Eminli, S., Tan, K. Y., et al. (2010) Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*,**28**(8), 848–855.

Reubinoff, B. E., Pera, M. F., Fong, C. Y., Trounson, A., and Bongso, A. (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature biotechnology*,**18**(4), 399–404.

Robertson, E., Bradley, A., Kuehn, M., and Evans, M. (1986) Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector. *Nature*,**323**(6087), 445–448.

Rosenthal, M. D., Wishnow, R. M., and Sato, G. H. (1970) In vitro growth and differentiation of clonal populations of multipotential mouse cells derived from a transplantable testicular teratocarcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*,**44**(5), 1001–1014.

Rossant, J. (1975) Investigation of the determinative state of the mouse inner cell mass. II. The fate of isolated inner cell masses transferred to the oviduct. *Journal of embryology and experimental morphology*,**33**(4), 991–1001.

Scheper, W., and Copray, S. (2009) The molecular mechanism of induced pluripotency: a two-stage switch. *Stem cell reviews*,**5**(3), 204–223.

Schuldiner, M., Itskovitz-Eldor, J., and Benvenisty, N. (2003) Selective ablation of human embryonic stem cells expressing a “suicide” gene. *Stem cells*,**21**(3), 257–265.

Shamblott, M. J., Axelman, J., Wang, S., Bugg, E. M., Littlefield, J. W., Donovan, P. J., et al. (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**95**(23), 13726–13731.

Simons, B. D., and Clevers, H. (2011) Strategies for homeostatic stem cell self-renewal in adult tissues. *Cell*,**145**(6), 851–862.

Soldner, F., Hockemeyer, D., Beard, C., Gao, Q., Bell, G. W., Cook, E. G., et al. (2009) Parkinson’s disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*,**136**(5), 964–977.

Soldner, F., Laganière, J., Cheng, A. W., Hockemeyer, D., Gao, Q., Alagappan, R., et al. (2011) Generation of Isogenic Pluripotent Stem Cells Differing Exclusively at Two Early Onset Parkinson Point Mutations. *Cell*,**146**(2), 318–331.

- Son, E. Y., Ichida, J. K., Wainger, B. J., Toma, J. S., Rafuse, V. F., Woolf, C. J., et al. (2011) Conversion of Mouse and Human Fibroblasts into Functional Spinal Motor Neurons. *Cell Stem Cell*,**9**(3), 205–218.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, **322**(5903), 945–949.
- Stevens, L. C. (1973) A new inbred subline of mice (129-terSv) with a high incidence of spontaneous congenital testicular teratomas. *Journal of the National Cancer Institute*,**50**(1), 235–242.
- Stevens, L. C., and Little, C. C. (1954) Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**40**(11), 1080–1087.
- Suzuki, K., Mitsui, K., Aizawa, E., Hasegawa, K., Kawase, E., Yamagishi, T., et al. (2008) Highly efficient transient gene expression and gene targeting in primate embryonic stem cells with helper-dependent adenoviral vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**105**(37), 13781–13786.
- Szabo, E., Rampalli, S., Risueño, R. M., Schnerch, A., Mitchell, R., Fiebig-Comyn, et al. (2010) Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature*,**468**(7323), 521–526.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., et al. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*,**131**(5), 861–872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*,**126**(4), 663–676.
- Tan, H. L., Fong, W. J., Lee, E. H., Yap, M., and Choo, A. (2009) mAb 84, a cytotoxic antibody that kills undifferentiated human embryonic stem cells via oncosis. *Stem cells*,**27**(8), 1792–1801.
- Tang, C., Lee, A. S., Volkmer, J. P., Sahoo, D., Nag, D., Mosley, A. R., et al. (2011) An antibody against SSEA-5 glycan on human pluripotent stem cells enables removal of teratoma-forming cells. *Nature Biotechnology*,**29**(9), 829–834.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., et al. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*,**282**(5391), 1145–1147.
- Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., et al. (1995) Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**92**(17), 7844–7848.
- Toyoda, M., Yamazaki-Inoue, M., Itakura, Y., Kuno, A., Ogawa, T., Yamada, M., Akutsu, H., et al. (2011) Lectin microarray analysis of pluripotent and multipotent stem cells. *Genes Cells*,**16**(1), 1–11.
- Uccelli, A., Laroni, A., and Freedman, M. S. (2011) Mesenchymal stem cells for the treatment of multiple sclerosis and other neurological diseases. *Lancet neurology*,**10**(7), 649–656.
- Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews. Immunology*,**8**(9), 726–736.
- Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G. Q., and Benvenisty, N. (2010) Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell*,**6**(5), 407–411.
- Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Pang, Z. P., Kokubu, Y., Südhof, T. C., and Wernig, M. (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature*,**463**(7284), 1035–1041.
- Waddington, C. (1957) *The Strategy of the genes, a discussion of some aspects of theoretical biology* (London: G. Allen and Unwin).
- Wang, Y. C., Nakagawa, M., Garitaonandia, I., Slavin, I., Altun, G., Lacharite, R. M., et al. (2011) Specific lectin biomarkers for isolation of human pluripotent stem cells identified through array-based glycomic analysis. *Cell research*
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y. H., Li, H., Lau, F., et al. (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell stem cell*,**7**(5), 618–630.
- Wichterle, H., Lieberam, I., Porter, J. A., and Jessell, T. M. (2002) Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell*,**110**(3), 385–397.
- Wilmot, I., Beaujean, N., de Sousa, P. A., Dinnyes, A., King, T. J., Paterson, L. A., et al. (2002) Somatic cell nuclear transfer. *Nature*,**419**(6907), 583–586.
- Wilmot, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., and Campbell, K. H. (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*,**385**(6619), 810–813.

- Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., et al. (2009) piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*,**458**(7239), 766–770.
- Yang, Y., and Seed, B. (2003) Site-specific gene targeting in mouse embryonic stem cells with intact bacterial artificial chromosomes. *Nature biotechnology*,**21**(4), 447–451.
- Yao, S., Chen, S., Clark, J., Hao, E., Beattie, G. M., Hayek, A., et al. (2006) Long-term self-renewal and directed differentiation of human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,**103**(18), 6907–6912.
- Young, R. A. (2011) Control of the embryonic stem cell state. *Cell*,**144**(6), 940–954.
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I., and Thomson, J. A. (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*,**324**(5928), 797–801.
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, et al. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*,**318**(5858), 1917–1920.
- Zhao, T., Zhang, Z. N., Rong, Z., and Xu, Y. (2011) Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*,**474**(7350), 212–215.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J. Y., Zhu, S., Han, D. W., Lin, T., et al. (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell stem cell*,**4**(5), 381–384.

MENISCAL REPAIR AND REPLACEMENT: WHERE DO WE STAND?

Dr. D. René Verdonk

Profesor Emérito y ex Director del Departamento de Ortopedia
y Traumatología de la Universidad Estatal Gent (Bélgica)

en su investidura como Doctor Honoris Causa
por la Universidad Católica San Antonio de Murcia

The Indications for and Techniques in the Use of Meniscal Allografts of the Knee

R. Verdonk MD, PhD, K.F. Almqvist MD, PhD , P. Verdonk MD, PhD

| | |
|-----------------------|------------------------|
| Title | MD, PhD |
| Name of the author | René Verdonk |
| University or company | Ghent State University |
| Faculty or department | Faculty of Medicine |
| Street | St Pieters nieuwstraat |
| ZIP code, city | B 9000 Gent |
| Country | Belgium |
| E-mail | rene.verdonk@ugent.be |
| Telephone | +32 9 2215166 |

| | |
|-----------------------|----------------------------|
| Title | MD, PhD |
| Name of the author | Peter Verdonk |
| University or company | Monica Hospitals Antwerpen |
| Faculty or department | Antwerp Orthopaedic Center |
| Street | Harmoniestraat 68 |
| ZIP code, city | B 2000 Antwerpen |
| Country | Belgium |
| E-mail | pverdonk@yahoo.com |
| Telephone | +32 3 2402272 |

| | |
|-----------------------|---------------------------|
| Title | MD, PhD |
| Name of the author | Karl F Almqvist |
| University or company | Ghent State University |
| Faculty or department | Faculty of Medecine |
| Street | Sint Pietersnieuwstraat |
| ZIP code, city | B 9000 Gent |
| Country | Belgium |
| E-mail | Fredrik.almqvist@ugent.be |
| Telephone | +32 497 241467 |

1. Abstract

Meniscal allograft transplantation has emerged as a useful treatment for carefully selected patients. Almost all studies, from short- to long-term (>10 years of follow-up), report patient satisfaction and improvement in pain and function.

Objectively, physical examination findings are improved in the majority of patients. Radiologically, joint space narrowing is only significantly progressive at long-term follow-up. On magnetic resonance imaging (MRI), shrinkage is seen after some years, but more in lyophilized allografts. Histologically, incomplete repopulation of the graft is noticed. Second-look arthroscopy usually shows good healing of the capsule. In a recent long-term study, progression of cartilage degeneration according to MRI and radiological criteria was halted in a number of patients, indicating a chondroprotective effect.

However, there still is a lac of consensus on how the success of a meniscal transplantation should be evaluated, which makes it difficult to compare study outcomes. In our opinion, radiographic measurement of joint space narrowing and changes in meniscal allograft MR signal are the best assessment tools, but the use of a good clinical evaluation system, such as the International Knee Documentation Committee (IKDC) and the Hospital for Special Surgery (HSS) scoring system, remains essential.

2. Indications

According to current recommendations, meniscal allograft transplantation is indicated in three specific clinical settings:

1. Young patients with a history of meniscectomy who have pain localized to the meniscus-deficient compartment, a stable knee joint, no mal-alignment and articular cartilage with only minor evidence of osteochondral degenerative changes (no more than grade 3 according to the International Cartilage Repair Society (ICRS) classification system (Table 1) are considered ideal candidates for this procedure. Some studies [1–6] have shown that meniscal allografts can survive in an osteoarthritic joint (Outerbridge grade 3–4), with significant improvement in pain and function. Because of the more rapid deterioration in the lateral compartment [7], a relatively common

indication for meniscal transplantation would be a symptomatic, meniscus-deficient, lateral compartment.

2. Anterior cruciate ligament (ACL)-deficient patients who have had previous medial meniscectomy with concomitant ACL reconstruction and who might benefit from the increased stability afforded by a functional medial meniscus. It is the authors' conviction that an ACL graft is significantly protected by the meniscus allograft as much as the meniscus is protected by an ACL graft.

3. In an effort to avert early joint degeneration, some also consider young, athletic patients who have had total meniscectomy as candidates for meniscal transplantation prior to symptom onset [8]. However, the results obtained so far still preclude a return to high-impact sports.

3. Contraindications

Advanced chondral degeneration is considered a contraindication to meniscal allograft transplantation, although some studies suggest that cartilage degeneration is not a significant risk factor for failure [9]. In general, greater than grade 3 articular cartilage lesions, according to the ICRS classification system, should be of limited surface area and localized. Localized chondral defects may be treated concomitantly, as meniscus transplantation and cartilage repair or restoration may benefit each other in terms of healing and outcome [10]. Chondrocyte transplantation or osteochondral grafting procedures should be performed after completion of the meniscal transplantation in order to prevent accidental damage to the patch or graft during meniscal allograft insertion [11]. Radiographic evidence of significant osteophyte formation or femoral condyle flattening is associated with inferior postoperative results because these structural modifications alter the morphology of the femoral condyle [12]. Generally, patients over age 50 have excessive cartilage lesions and are sub-optimal candidates. Axial malalignment tends to exert abnormal pressure on the allograft leading to loosening, degeneration and failure of the graft [12]. A corrective osteotomy should be considered in patients with more than two degrees of deviation toward the involved compartment, as compared with the mechanical axis of the contralateral limb. Varus or valgus deformity

may be managed with either staged or concomitant high tibial or distal femoral osteotomy [11]. However, as in any situation in which procedures are combined, it is unclear which aspect of the procedure is implicated in symptom resolution, such as relief of pain [12]. Other contraindications to meniscal transplantation are obesity, skeletal immaturity, instability of the knee joint (which may be addressed in conjunction with transplantation), synovial disease, inflammatory arthritis and previous joint infection and obvious squaring of the femoral condyle.

4. Technique for Meniscal Transplantation

4.1. Preoperative considerations

In contrast to the use of deep-frozen allografts, a strict time schedule from harvest to transplantation is mandatory for viable allografts. The transplantation of viable meniscal allografts implies the availability of *viable* donor tissues, cultured in vitro immediately following harvest. Sizing of the graft is critical for correct implantation. For deep-frozen allografts the mediolateral and anteroposterior length of the tibial plateau of the receptor are measured on a calibrated X-ray and transferred to the tissue bank. Since viable meniscal allografting is more limited in size-options due to the fact that there is only 1 donor and a limited number of acceptors, the most appropriate acceptor is chosen based on corresponding donor-acceptor height and weight criteria. Once a patient is deemed to be a candidate for this type of procedure, 30 to 50 ml of autologous serum is prepared and frozen at -21°C. The waiting time for a viable meniscal allograft averages 2 months - ranging from 14 days to 6 months - at our institution. Once an appropriately sized meniscal allograft is harvested, the patient is notified and an operation is planned within the next 14 days.

4.2. Surgical Technique

4.2.1 INTRODUCTION

The purpose of this technical chapter is to present medial and lateral

meniscal allograft transplantation (1) as an open procedure or (2) as an arthroscopically assisted procedure. Both techniques use primarily soft tissue fixation of the allograft to the native meniscal rim. Additional transosseous fixation of the anterior and posterior horn is used in the arthroscopic technique, while a tag on the anterior horn is used in the open procedure for soft tissue-bone fixation.

4.2.2 ANAESTHESIA AND SURGICAL PREPARATION

These items are identical for the open and arthroscopic procedure.

The choice of anaesthesia is made in consultation between the surgeon, the anaesthesiologist and the patient and depends on patient's age, comorbidity and history with regard to previous anaesthesia. General anaesthesia is preferred at our institution.

The patient is then positioned supine on the operating table. A lateral leg-holder is positioned at the height of the tourniquet with the leg positioned in 90 degrees of flexion. A foot holder is used to hold the leg in 90 and 110 degrees of flexion as needed. Previous skin incisions are marked. The limb is exsanguinated and the tourniquet is inflated. The limb is then prepared with chlorhexidine gluconate-alcohol solution (Hibitane, Regent Medical Overseas Limited, Manchester, UK) and draped at the mid-thigh level.

4.2.3 ALLOGRAFT PREPARATION FOR THE OPEN PROCEDURE

As previously described elsewhere, the allograft is positioned and fixed on a specially designed cork board with three 25 gauge needles. [13] With a scalpel, the residual synovial tissue is dissected from the allograft meniscus at the meniscosynovial junction level and discarded.

The upper side of the allograft is marked with a methylene blue skin marker.

Horizontal 2/0 polydioxanone surgical sutures (PDS II mounted on a double small needle, Ethicon, Somerville, NJ, USA) or 2/0 non-absorbable polypropylene sutures (Prolene mounted on a double small needle, Ethicon, Somerville, NJ, USA) are placed every 3 to 5 mm through the posterior horn, the body and the anterior horn of the allograft and fixed onto a specially designed suture holder (holder A). The senior surgeon (RV) prefers the use of 2/0 Prolene sutures for the posterior horn since this suture material comes

with slightly smaller needles and therefore has easier surgical handling in the more narrow posterior joint space. The sutures are fixed onto the suture holder in sequence from posteriorly to anteriorly. Generally 6 to 8 sutures are needed to cover the complete allograft.

4.2.4 OPEN MENISCAL ALLOGRAFT TRANSPLANTATION

A medial or lateral parapatellar incision of approximately 8 cm is made with the knee in 90 degrees of flexion to gain access to the involved compartment of the knee joint. The joint capsule is then opened and the anterior horn of the meniscus remnant is transected.

For the lateral procedure, the iliotibial band is released subperiostally from its distal attachment. To further open up the lateral compartment, the insertion the lateral collateral ligament (LCL) and popliteus tendon (PT) are detached with a curved osteotomy on the femoral side. [Figure 1] The centre of the osteotomy bone block is first predrilled with a 2.7 mm drill. This facilitates subsequent refixation with a screw and washer. The osteotomy is done in a clockwise direction from the 8 o'clock position to the 4 o'clock position and is approximately 1.5 cm deep and conically shaped. The bone block is gently folded out using a bone clamp and then the osteotomy is completed inferiorly from the 4 o'clock to the 8 o'clock position using the osteotome. The lateral joint space can now be opened up easily 1 to 2 cm by placing the knee in the figure of 4 position in 70 to 90 degrees of flexion with the index foot positioned across the contralateral limb.

For the medial procedure, the medial collateral ligament is detached on the femoral side with an osteotomy. [14] A flake osteotomy (0.5 to 1 cm in thickness) is done with a straight osteotome at the level of the medial femoral epicondyle. The soft tissues posterior to the medial collateral ligament are left in continuity. By gently placing the knee in a valgus position, the medial compartment can now be opened up in a controlled fashion.

The meniscus remnant is trimmed preferably to a stable meniscal rim with a scalpel anteriorly and with arthroscopic instruments posteriorly. Most often, the insertion of the posterior horn is still intact and in continuity with the tibial plateau. The insertion of the posterior horn is also trimmed to fit the allograft. The meniscal rim deserves surgical attention, as it serves as a strong envelope encapsulating the medial or lateral compartment of the knee.

The meniscal remnant level is then marked with a small mosquito clamp anteriorly as landmark for the correct level of subsequent fixation of the allograft. Next, the previously prepared viable meniscal allograft is introduced into the knee compartment. The sutures are taken from the holder in the correct sequence from posteriorly to anteriorly and driven through the meniscal rim one by one in an all-inside fashion from inferiorly to superiorly and transferred to a second suture holder (holder B), again in a sequence from posteriorly to anteriorly. The lateral allograft is also sutured to the popliteus tendon. We have found on follow-up arthroscopies that the popliteal hiatus will recreate itself naturally. The insertion of the anterior horn of the meniscus is not yet sutured at this stage of the operation. Once the sequence of suture transfer from holder A through the meniscal rim (and popliteal tendon) to holder B is completed, the allograft is introduced into the compartment by gently pulling on each suture in a sequence from posteriorly to anteriorly. Generally, this procedure has to be performed progressively to establish a secure fit of the allograft to the meniscal rim. The suture knots are then securely tied and cut. A fine-tipped suture driver and knot pusher are frequently required to securely tighten the posterior sutures. The knee is now positioned again in a normal 90 degrees flexed position. The bone block of the collateral ligament and popliteus tendon is repositioned and fixed using a 35 or 40 mm 2.9 AO cancellous screw with a spiked washer. The anterior horn of the allograft is then fixed to the tibia using an anchor (GII, Depuy Mitek, Raynham, Massachusetts, USA). The Hoffa fat pad and knee capsule are closed using interrupted Vicryl 1/0 (Ethicon, Somerville, NJ, USA) cross stitches after haemostasis.

4.2.5 ALLOGRAFT PREPARATION FOR THE ARTHROSCOPIC PROCEDURE

The allograft is positioned and fixed on a specially designed cork board with three 25 gauge needles. With a scalpel, the residual synovial tissue is dissected from the allograft meniscus at the meniscosynovial junction level and discarded.

The upper side of the allograft is marked with a methylene blue skin marker.

Non-resorbable high-strength (Fibre wire, Arthrex, Naples, USA) sutures are placed in the anterior and posterior horn of the allograft.

Generally, 3 whipstitches are placed on the inner and outer rim of the horn of the allograft. An additional vertical non-resorbable suture (Ethibond 2/0, Somerville, NJ, USA) is placed at the posteromedial or posterolateral corner of the medial or lateral allograft, respectively. For the lateral allograft, the posterolateral suture is positioned just anteriorly to the popliteus tendon hiatus as this will serve as a landmark during arthroscopy [Figure 2].

4.2.5.1 Arthroscopically Assisted Lateral Meniscal Allograft Transplantation

The classic anteromedial and anterolateral portals are made. An additional anteromedial portal is positioned very medially to gain easy instrumental access for the debridement and resection of the anterior portion of the native lateral meniscus. Using shaver and punch the remnant meniscus is debrided to the level of the meniscal rim.

A modified ACL aiming device, with a low profile tip, is inserted through the medial portal and positioned at the anatomical posterior horn of the lateral meniscus just posterior to the ACL [Figure 3]. A guide pin is drilled first and subsequently overdrilled by a 4.5mm cannulated drill. A double loop metal wire is introduced through the tunnel from outside-in and picked up intra-articularly with an arthroscopical grasper and pulled out through the lateral portal. Subsequently, a suture passer (Acupass, Smith and Nephew, Memphis, Tennessee, USA) is introduced twice from outside-in just anterior to the lateral collateral ligament and the popliteus tendon into the joint: one just below and the second above the native meniscal rim [Figure 4]. The looped wires are picked up and pulled out again through the lateral portal. Next, the posterior horn pull suture and the posterolateral pull suture are pulled through using the double looped metal wire and the double looped suture pass wire. The prepared lateral allograft is subsequently introduced into the lateral compartment throughout an enlarged lateral portal by pulling progressively on the posterolateral pull suture and the posterior horn pull suture. Care should be taken that the graft does not flip upon introduction and that pull wires do not intertwine. Risk for intertwining wires is greatly reduced by using a double loop metal wire for the posterior horn.

The posterior horn is now positioned correctly. Its position can be slightly modified more towards the posterolateral corner or more towards

the posterior horn by pulling more on the posterolateral or posterior horn traction wire. One or two all-inside meniscal fixation devices (Fastfix, Smith and Nephew, Memphis, Tennessee, USA) are used to fix the allograft to the meniscal rim. Fixation should be started in the posterolateral corner. Subsequently inside out horizontal Ethibond 2/0 sutures are used for fixing the body of the allograft. The anterior horn is fixed using outside in PDS or Ethibond 2/0 sutures.

Prior to making the sutures knots, the anterior horn is introduced into the knee joint and the anatomical insertion site is identified and prepared in a same manner as for the posterior tunnel. If necessary, its position can be slightly adapted to the graft position. Similar to the procedure of the posterior horn, the anterior tunnel is prepared and the traction suture is pulled through.

First, the meniscal inside out sutures are knotted. Subsequently, the anterior and posterior horn traction sutures are knotted to each other over a bone bridge on the anteromedial side of the tibia. This procedure reduces the possibly stretched capsule and native meniscal rim tied to the meniscal allograft, by pulling on the anterior and posterior horn by a transosseus suture fixation.

4.2.5.2 Arthroscopically Assisted Medial Meniscal Allograft Transplantation

A similar procedure as for the lateral allograft transplantation is performed for the medial allograft transplantation. However, some steps are different and will be highlighted in this section.

Additional to the classic anteromedial and anterolateral portal, a posteromedial portal should be used to identify the original posterior horn attachments of the native meniscus [Figure 5]. Using the same drill guide, the transosseus tunnels can be prepared. These tunnels should be prepared starting on the anterolateral side of the tibia. This direction is more in line with the forces on the traction sutures.

A posteromedial traction suture is used, as in accordance to the lateral allograft. On the medial side, however, we lack a clear anatomical landmark such as the popliteal hiatus on the lateral side.

The anterior horn of the native medial meniscus may in some cases be very anterior on the tibial plateau resulting in a very short transosseus anterior tunnel.

Special note on soft tissue vs bone block fixation. [15 – 19]

Biomechanical cadaver studies have shown the superiority of a bony fixation over a soft tissue fixation technique, although a recent cadaver study showed comparable results. Bony fixation however, has also been shown to be associated with increased risk for cartilage lesions if implanted incorrectly and an increased immunological potential due to the presence of allogeneic bone. It is the authors experience that perfect allograft size matching is essential if bony fixation is to be used. A malpositioned bone block or plugs can inflict damages to the overlying cartilage. Too small a graft will result in a need to overtension the inside out sutures and possible failure of the soft tissue fixation. Therefore, limited oversizing of the graft is commonly advocated using bone plugs or blocks. Separate bone plugs have the potential advantage that the implantation can be somewhat more variable compared to a single bone block. In addition, on the lateral side a straight bone block sometimes induces the need to sacrifice some posterolateral fibers of the ACL.

Today, clinical and/or radiological differences have not been shown between soft tissue or bone block fixation.

5. Rehabilitation

Rehabilitation is initially focused on providing mobility to the joint without endangering ingrowth and healing of the graft. Therefore, 3 weeks of non-weight-bearing are prescribed followed by 3 weeks of partial weight bearing (50% of body weight). Progression to full weight bearing is allowed from week 6 on to week 10 postoperatively. The use of a knee brace is not strictly necessary and depends on the morphology and profile of the patient. For the same reasons, range of motion is limited during the first 2 weeks from 0 to 30, to increase by 30 degrees each 2 weeks.

Isometric muscle tonification and co-contraction exercises are prescribed from day 1 post-surgery on. Straight leg raise however, is prohibited during the first 3 weeks. Proprioception training is started after week 3.

Swimming is allowed after week 6, biking after week 12 and running is progressively promoted starting at week 20.

6. Conclusion

In conclusion, ample evidence has been presented to support meniscus allograft transplantation in meniscectomized painful knees, with observance of the proper indications. Significant relief of pain and improvement in function have been achieved in a high percentage of patients. These improvements appear to be long-lasting in 70% of patients. Based on plain radiology and MRI, a subset of patients does not show further cartilage degeneration, indicating a potential chondro-protective effect. The lack of a conservatively

treated control group is considered a fundamental flaw in the reported studies, making it difficult to establish the true chondro-protective effect of this type of treatment. Based on the presented results, meniscus allograft transplantation should no longer be considered experimental surgery for the meniscectomized painful knee.

7. Tables

Table 1

International Cartilage Repair Society Cartilage Lesion Evaluation System

| | |
|---------|---|
| Grade 0 | Normal |
| Grade 1 | Superficial lesions, softening, fissures or cracks |
| Grade 2 | Lesions, erosion or ulceration of less than 50% |
| Grade 3 | Partial-thickness defect of more than 50%, but less than 100% |
| Grade 4 | Ulceration and bone exposure |

8. Figure Legends

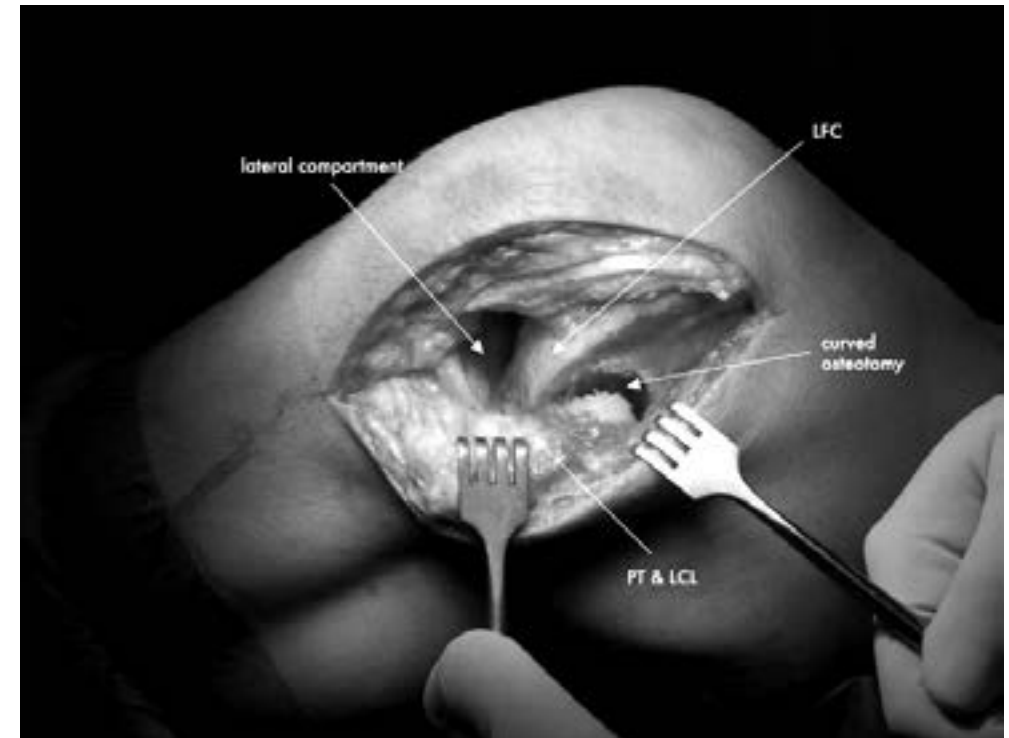


Figure 1

Open meniscal allograft transplantation. To further open the lateral compartment, the LCL and PT are detached with a curved osteotomy on the femoral side

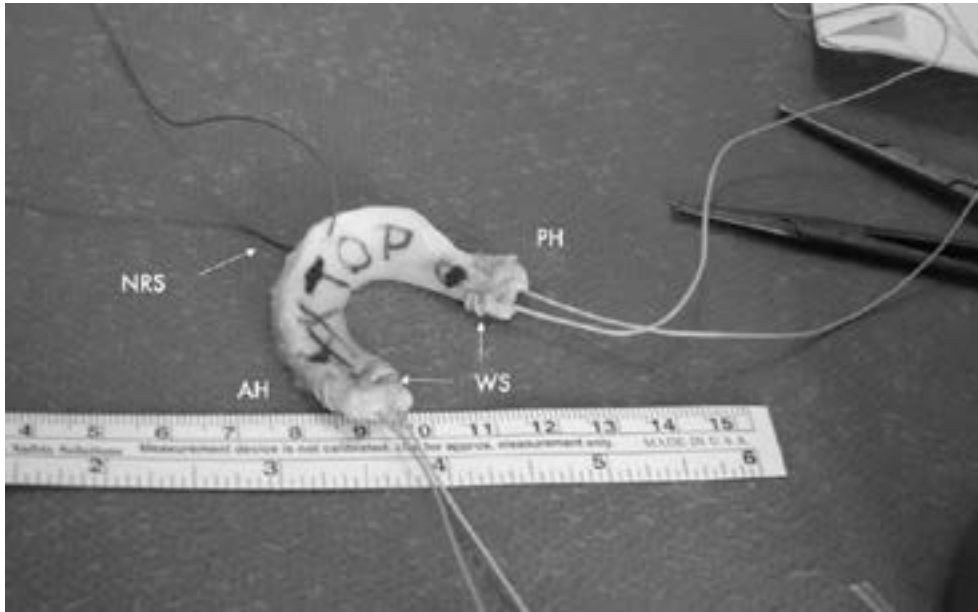


Figure 2

Prepared lateral meniscal allograft for arthroscopic meniscal transplantation. Whipstitches (WS) on inner and outer rim of anterior (AH) and posterior horn (PH). A vertical non-resorbable suture (NRS) is placed on the posterolateral corner, just anteriorly of the PT hiatus.



Figure 3

Modified ACL aiming device, with low profile tip. This device is positioned at the anatomical posterior horn of the lateral meniscus, just posterior to the ACL.

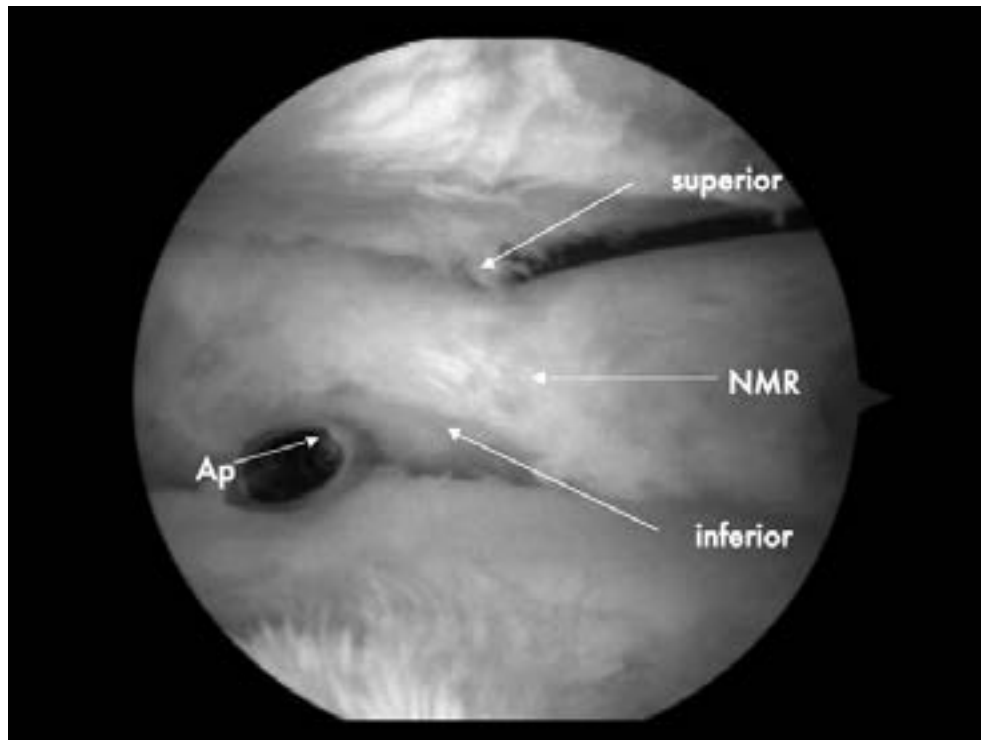


Figure 4

A suture passer (Acupass ®Ap) is introduced twice from outside-in, just anterior to the LCL and the PT, superior and inferior of the native meniscal rim (NMR).



Figure 5

Arthroscopical view of the posteromedial portal used in arthroscopically assisted medial meniscal allograft transplantation. The custom ACL guide is introduced through the intercondylar notch on the anatomical posterior horn insertion of the native medial meniscus.

9. References

1. Cameron JC, Saha S (1997) Meniscal allograft transplantation for unicompartmental arthritis of the knee. *Clin Orthop* 337:164–171
2. Noyes FR, Barber-Westin SD (1995) Irradiated meniscus allografts in the human knee: a two to five year follow-up. *Orthop Trans* 19:417
3. Verdonk PCM, Demurie A, Almqvist KF, Veys EM, Verbruggen VR (2005) Transplantation of viable meniscal allograft: survivorship analysis and clinical outcome of one hundred cases. *J Bone Joint Surg Am* 87:715–724
4. Ryu RK, Dunbar VWH, Morse GG (2002) Meniscal allograft replacement: a 1-year to 6-year experience. *Arthroscopy* 18:989–994
5. Stone KR, Walgenbach AW, Turek TJ, Freyer A, Hill MD (2006) Meniscus allograft survival in patients with moderate to severe unicompartmental arthritis: a 2- to 7-year followup. *Arthroscopy* 22(5):469–478
6. Bhosale AM, Myint P, Roberts S, Menage J, Harrison P, Ashton B, Smith T, McCall I, Richardson JB (2007) Combined autologous chondrocyte implantation and allogenic meniscus transplantation: a biological knee replacement. *Knee* 14(5):361–368
7. Walker PS, Erkman MJ (1975) The role of the menisci in force transmission across the knee. *Clin Orthop* 109: 184–192
8. Johnson DL, Bealle D (1999) Meniscal allograft trans-plantation. *Clin Sports Med* 18:93–108
9. Cole BJ, Carter TR, Rodeo SA (2003) Allograft meniscal transplantation: background, techniques, and results. *Instr Course Lect* 52:383–396
10. Rodeo SA (2001) Meniscal allografts – where do we stand? *Am J Sports Med* 29:246–261
11. Cole BJ, Cohen B (2000) Chondral injuries of the knee. A contemporary view of cartilage restoration. *Orthop Spec Ed* 6:71–76
12. Rijk PC (2004) Meniscal allograft transplantation – part I: background, results, graft selection and preservation, and surgical considerations. *Arthroscopy* 20:728–743
13. Verdonk PC, Demurie A, Almqvist KF, Veys EM, Verbruggen G, Verdonk R. Transplantation of viable meniscal allograft. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am*. 2006 Mar;88:109-18. Review.
14. Goble EM, Verdonk R, Kohn D. Arthroscopic and open surgical techniques for meniscus replacement--meniscal allograft transplantation and tendon autograft transplantation. *Scand J Med Sci Sports*. 1999 Jun;9(3):168-76.
15. Messner K, Verdonk R. It is necessary to anchor the meniscal transplants with bone plugs? A mini-battle. *Scand J Med Sci Sports*. 1999 Jun;9(3):186-7.
16. Paletta GA Jr, Manning T, Snell E, Parker R, Bergfeld J. The effect of allograft meniscal replacement on intraarticular contact area and pressures in the human knee. A biomechanical study. *Am J Sports Med*. 1997;25:692-8.
17. Huang A, Hull ML, Howell SM. The level of compressive load affects conclusions from statistical analyses to determine whether a lateral meniscal autograft restores tibial contact pressure to normal: a study in human cadaveric knees. *J Orthop Res*. 2003;21:459-64.
18. Chen MI, Branch TP, Hutton WC. Is it important to secure the horns during lateral meniscal transplantation? A cadaveric study. *Arthroscopy*. 1996;12:174-81.
19. Alhalki MM, Howell SM, Hull ML. How three methods for fixing a medial meniscal autograft affect tibial contact mechanics. *Am J Sports Med*. 1999;27:320-8.



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
SAN ANTONIO

