



Universidade de Aveiro Departamento de Línguas e Culturas

Ano 2012

**BRUNO RAFAEL
ASSIS DA VEIGA**

***INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS:*
TRADUÇÃO E TERMINOLOGIA**



**BRUNO RAFAEL
ASSIS DA VEIGA**

***INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS:
TRADUÇÃO E TERMINOLOGIA***

Projeto apresentado à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Tradução Especializada realizado sob a orientação da Prof. Doutora Maria Teresa Murcho Alegre, Professora Auxiliar do Departamento de Línguas e Culturas da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos, amigos e professores

o júri

presidente

Prof.^a Doutora Susan Jean Howcroft
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro

Prof.^a Doutora Margarida Sâncio da Cruz Fardilha
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro (arguente)

Prof.^a Doutora Maria Teresa Murcho Alegre
Professora Auxiliar da Universidade de Aveiro (orientadora)

agradecimentos

Dirijo o meu sincero reconhecimento à minha orientadora, a Professora Doutora Maria Teresa Murcha Alegre, que esteve presente ao longo do meu percurso, que me orientou da melhor maneira, mostrando-se sempre disponível para responder a todas as minhas perguntas e dúvidas.

Agradeço aos meus pais por tudo o que me deram e pelo acompanhamento durante estes anos de universidade e não só. Ao meu irmão e irmã por serem como são e à minha família por todo o apoio. A eles o meu muito obrigado.

Agradeço a todos os professores que me marcaram neste meu longo percurso académico.

Aos amigos pela força que me deram e por todos os momentos fantásticos que passei com eles.

Também gostaria de agradecer à minha namorada pelos bons momentos passados na biblioteca da UA e por toda a força que me deu, em especial, na parte final da elaboração deste relatório quando a vontade e a motivação estavam em níveis muito baixos.

palavras-chave:

Induced Pluripotent Stem Cells, tradução, células estaminais, células da pele, Sibel Yildirim, controvérsia.

resumo

Nos dias de hoje existe uma controvérsia enorme em torno do uso de células estaminais provenientes do cordão umbilical e das células estaminais de fetos. Esta é uma controvérsia com a qual os cientistas têm lidado todos os dias. Agora existe um tipo de células em tudo semelhante às células estaminais, no entanto, estas não provêm de células estaminais de fetos ou do cordão umbilical, mas sim de células maduras – células da pele. De forma a conciliar a necessidade de realizar um projeto de tradução especializada com a vontade de divulgar um tema tão importante em língua portuguesa, optou-se por escolher uma obra científica recente sobre este tipo de células como texto de partida.

Portugal possui um dos melhores, senão o melhor, centro de pesquisa a nível mundial, o Centro de Investigação Champalimaud. Este centro, a par com outros, trabalha preferencialmente em inglês, pelo que as pessoas pouco familiarizadas com esta língua podem ter dificuldades na compreensão destes textos, e por isso urge a necessidade de haver textos em português que possam auxiliar essas pessoas.

A tradução deste livro levou à criação de uma base de dados terminológica, ainda não acabada, devido à sua linguagem altamente técnica. A base de dados terminológica poderá ser útil para o público-alvo tal como para outros tradutores em traduções sobre um tema similar.

O presente relatório tem como objetivo mostrar cada uma das fases de tradução realizadas, desde a escolha do tema, o processo de tradução, as dificuldades, os recursos utilizados, acabando com uma reflexão crítica sobre o projeto.

keywords

Induced pluripotent stem cells, Translation, Stem cells, Skin cells, Sibel Yildirim, controversy

abstract

Nowadays there is a huge controversy surrounding the use of stem cells from the umbilical cord and fetal stem cells. This is a controversy with which scientists have dealt every day. But now there is a type of cell that is similar to the stem cells. However, they do not originate from fetal stem cells or from the umbilical cord, but from mature cells - skin cells. In order to promote this recently issue there was the need of doing something, in Portuguese, addressing to this cell type.

Portugal has one of the best, if not the best, research center in the world, the Champalimaud Research Centre. Because the official working language of this center is the English language all the work is published in English and for the people less familiarized with the language that can be difficult. Therefore there is the need of having papers in Portuguese that can aid that people.

The translation of this book led to the creation of a terminology database due to its highly technical language. This database can be useful for the audience as for other translators dealing with a similar theme.

This report aims to show each step taken, from the choice of the theme, the translation process, the difficulties, the resources used, ending with a critical reflection on the project.

Índice

Introdução.....	1
1. Contextualização e enquadramento.....	5
2. Breves considerações sobre o tema.....	7
2.1 Livro: <i>Induced Pluripotent Stem Cells</i> de Sibel Yildirim.....	7
2.2 Células estaminais pluripotentes induzidas.....	11
3. Tradução e critérios de qualidade.....	15
4. Público-alvo.....	21
5. Análise e caracterização do documento.....	23
5.1 Tipologia Textual.....	23
6. Metodologia de tradução.....	37
6.1 O processo de tradução.....	37
6.2 Os recursos utilizados na tradução.....	39
6.3 A revisão do documento.....	43
7. Problemas de tradução.....	45
8. Base de dados terminológica.....	53
8.1 Terminologia.....	53
8.2 Elaboração da base de dados terminológica.....	54
9. Reflexão crítica.....	57
Conclusão.....	59
Referências.....	61
Anexos	
Tradução (Texto de chegada)	
Texto de partida	
Índice de Siglas /Acrónimos	
Base de dados terminológica (Em CD)	

Introdução

Este trabalho insere-se no projeto de Mestrado de Tradução Especializada, e com o mesmo faz-se uso de todos os conhecimentos apreendidos durante os três anos de Licenciatura em Tradução e dois anos de Mestrado em Tradução Especializada. O tema abordado insere-se no objetivo deste projeto visto estar inserido na área à qual este mestrado está integrado, a área da Saúde e Ciências da Vida. De realçar que para o desenrolar deste trabalho foi muito útil recorrer a todos os conhecimentos obtidos durante os cinco anos de estudo na área da tradução, representando este projeto de mestrado o colmatar de um longo caminho.

Este projeto está dividido em três partes distintas: a tradução do livro *Induced Pluripotent Stem Cells* de inglês para português; o glossário em inglês e português, onde se insere, quando possível, o termo, a sigla, um sinónimo, a definição e a respetiva fonte, tanto para a língua inglesa como para a portuguesa; e por fim o relatório comentado sobre a tradução elaborada, onde é feita uma análise crítica sobre todo o trabalho desenvolvido.

A motivação para este trabalho partiu do grande interesse que o autor deste projeto têm na área da genética. Este interesse aumentou aquando da realização de um relatório para a unidade curricular de Projeto/Estágio de Tradução Especializada, pois foi nesta disciplina que se tomou conhecimento do tema específico a abordar neste projeto e onde se adquiriu ainda mais conhecimentos na área da genética. Aquando da realização do trabalho acima referido o autor constatou que este tema é bastante estudado no nosso país, havendo alguns centros de pesquisa a funcionar em Portugal. No entanto, e devido ao facto desses centros terem a língua inglesa como língua de trabalho, a literatura existente é na sua grande maioria escrita em inglês, e este foi, também, um dos motivos que nos levou a elaborar uma tradução para o português de um livro de genética.

Pareceu-nos que o tema em questão, dada a quase inexistência de literatura em português, seria de grande relevância para a tradução especializada. Assim,

optou-se por uma obra nesta recente área de estudos e pelo tema atual das células estaminais pluripotentes induzidas.

Após a escolha do tema passou-se para a escolha de uma obra que fosse de uma publicação recente e relevante para a área de estudos do mestrado. Mais importante ainda seria o facto do mesmo ter de ser um estudo alargado na área. Pretendia-se, deste modo, levar o leitor a conhecer um pouco mais da história destas novas células antes de se passar para questões mais específicas da área. Crê-se que este livro, e embora os capítulos finais abordem mais a área de investigação da autora, é um bom ponto de partida para quem só agora se esteja a inteirar desta matéria.

O projeto realizado consiste numa abordagem ao domínio da genética, mais especificamente numa tradução de inglês para português de uma obra sobre células estaminais. Considera-se portanto este projeto relevante dada a sua atualidade e também porque o mesmo nos revela como tudo começou, levando o leitor numa espécie de viagem pelo tempo na área das células estaminais pluripotentes induzidas.

Este projeto de mestrado consiste na tradução de inglês para português de um livro, de uma investigadora turca, Sybel Yldirim. O livro em questão tem como título *Induced Pluripotent Stem Cells* e foi publicado pela editora Springer. De dizer também que um projeto deste tipo requer um grande trabalho de pesquisa na área da genética, servindo isto para aumentar os conhecimentos do tradutor, assim como do leitor, sobre este tema ainda tão desconhecido da sociedade. De referir que o livro original e a sua tradução poderão ser encontrados em anexo.

Em relação ao texto, trata-se de um livro que aborda uma parte muito específica da genética e que se encontra ainda a dar os primeiros passos. O principal objetivo do livro é mostrar-nos o que já foi feito na área, o que está a ser feito e abre também um pouco a porta do que se fará ou poderá fazer no futuro.

Esta é uma obra de carácter científico e informativo, onde é feita uma descrição detalhada dos estudos, materiais, métodos e dos resultados analisados. A sua linguagem é bastante complexa e daqui se depreende que é um livro destinado a um público muito especializado.

Relativamente à estrutura do texto, esta é simples, clara, concisa, bem estruturada, recorrendo geralmente ao uso de ilustrações, subtítulos, gráficos e

tabelas, de forma a possibilitar uma perfeita compreensão dos conteúdos e conceitos abordados, bem como cumprir a sua função primordial de dar a conhecer à comunidade científica os resultados das suas experiências e convencê-la das suas conclusões. Contém ainda uma extensa bibliografia a partir da qual a autora se baseou para a escrita do mesmo, sendo esta bastante completa, abrindo assim a porta a um maior aprofundamento sobre matéria.

Durante a tradução foi tido em conta que, devido à especificidade deste tema, esta não poderia ser uma simples tradução para o português. Embora seja uma tradução fiel do texto original foi necessário que a mensagem fosse passada de forma correta e compreensível, evitando assim que se criasse confusão no leitor. Foi necessário pois recorrer a uma escrita que respeitasse as características do texto científico, mas sempre com as devidas e necessárias adaptações ao português, quer de adequação estilística, quer gramatical, porque no fim o que interessa é que a mensagem passada seja compreendida pelo leitor. Para isso foi também tido em conta o público-alvo. Neste sentido, houve uma atenção especial em adequar o texto a critérios linguísticos e funcionais, ou seja, conferir clareza e coesão na exposição do conteúdo, sendo necessário, por vezes, adaptar o estilo, expressões e estruturas frásicas que não poderiam ser traduzidas literalmente, mantendo a sua função informativa e explicativa bem como a sua objetividade. A bibliografia existente na obra foi mantida na sua forma original para que não houvesse perda de informação ou alteração da mesma.

Neste relatório, procede-se a uma análise crítica do trabalho, caracterizando-se o texto de partida, explicitando o processo da tradução seguido, as ferramentas utilizadas, as fases pré e pós tradução, de acordo com as dificuldades e as estratégias encontradas e que foram seguidas.

A pesquisa sobre o tema centrou-se em textos paralelos, na sua maioria em inglês. Toda a pesquisa foi efetuada por via da internet pois não existem neste momento muitos trabalhos editados em papel e os que existem não se encontram acessíveis em bibliotecas, em particular na biblioteca da universidade de Aveiro. Nesta universidade foram encontrados alguns livros, três ou quatro, sobre a área da genética, mas nenhum deles abordava em concreto o tópico da tradução, pelo que se decidiu prescindir da sua consulta.

Finalmente, foi elaborado este relatório onde se explica em detalhe todo o processo que se percorreu desde a aquisição do livro até à sua tradução.

1. Contextualização e enquadramento

A obra selecionada para este projeto foi *Induced Pluripotent Stem Cells*, escrito por Sibel Yildirim e editado pela editora Springer, em 2011.

Os fatores que levaram à escolha deste livro foram variados sendo que o primeiro se prendeu com o facto de este trabalho ter de estar ligado ao âmbito deste mestrado, ou seja, a área das ciências da vida. Após ter estabelecido a área, restava ao tradutor pesquisar qual o tema que iria trabalhar concretamente, uma vez que nesta área existe uma imensidão de temas que podem servir de objeto de trabalho. Seguidamente houve a necessidade de se trabalhar um tema relevante para os dias de hoje. A escolha recaiu sobre a área da genética. De dizer também que não foi necessário efetuar-se uma pesquisa para ver se o livro se encontrava traduzido porque o mesmo tinha acabado de sair para o mercado.

De mencionar que o tema a abordar neste projeto de mestrado surgiu aquando da realização de um relatório para a unidade curricular de Projeto/Estágio de Tradução Especializada, pois foi nesta disciplina que se tomou conhecimento do tema específico a abordar neste projeto e onde se adquiriu ainda mais conhecimentos na área da genética.

Outro dos fatores que levaram o tradutor a traduzir este livro foi o facto de em Portugal não existirem muitos trabalhos traduzidos sobre este tema, sendo que este será muito falado num futuro próximo. O facto deste tema ser recente levou a que este trabalho fosse um desafio. Todos os trabalhos que serviram de apoio a esta tradução estavam escritos em inglês. É crença do autor deste projeto que este trabalho possa mais tarde vir a beneficiar os alunos que estão agora a entrar no mundo dos estudos genéticos, uma vez que o material de apoio de que dispõem é na sua maioria numa língua estrangeira, às vezes pouco conhecida por esses alunos, e também para que esses mesmos estudantes possam aprender lendo na sua própria língua. Crê-se que devido ao futuro que esta área nos pode proporcionar, o glossário elaborado no decorrer deste projeto será de extrema importância para futuras traduções e para os próprios tradutores. No que concerne a

este projeto espera-se também poder contribuir para a divulgação deste tema na língua portuguesa e também se espera que futuramente se possam ver mais trabalhos de genética escritos em português, para que a divulgação do tema se possa generalizar e, quem sabe, a língua portuguesa comece a ser mais ouvida pela comunidade científica, porque uma língua não falada num dado tema é uma língua esquecida para ele.

Para o âmbito deste projeto é necessário mencionar a existência de um centro de excelência no nosso país, o Centro de Investigação Champalimaud, ao qual o tradutor não está alheio e cuja investigação se centra em muito no estudo desta células, o que vem ainda dar mais força a este trabalho, porque um país com um centro destes é, quase que obrigatoriamente, um país virado para a pesquisa genética.

Curiosamente, aquando da realização de este trabalho, foi atribuído o Prémio Nobel da Medicina (2012) a dois investigadores, John B. Gurdon e Shinya Yamanaka – este último encontra-se mencionado neste relatório - pela descoberta de que as células maduras podem ser reprogramadas para se tornarem pluripotentes. Este facto vem provar que, embora com alguma sorte por parte do tradutor por a área galardoada com Nobel de 2012 corresponder à mesma deste trabalho, este é um tema que cada vez ganhará mais importância no futuro.

2. Breves considerações sobre o tema

2.1 Livro: *Induced Pluripotent Stem Cells*, de Sibel Yildirim

Neste tópico iremos dar algumas informações sobre o livro que foi traduzido no âmbito deste projeto de mestrado.

O livro em questão, *Induced Pluripotent Stem Cells (SpringerBriefs in Stem Cells)*, de Sybel Yildirim, foi lançado no dia 1 de dezembro de 2011 pela editora Springer – uma editora especializada na edição de livros na área das ciências, tecnologia e medicina – e mostra-nos um pouco deste novo e recente mundo das células estaminais pluripotentes induzidas. Este livro pode ser adquirido em várias livrarias espalhadas pelo mundo, no entanto, não foi possível encontrá-lo numa livraria portuguesa. Em Portugal o mesmo só pode ser adquirido via livrarias online, como a Amazon.

No seguimento das regras da editora, a autora do livro, Sybel Yildirim, é especialista na matéria, sendo professora associada na faculdade de medicina dentária, da universidade de Selcuk, na Turquia. No seu curriculum conta com um doutoramento em medicina dentária pediátrica e em histologia e embriologia. A sua investigação incide sobre a histologia e embriologia das células estaminais da polpa dentária. É também autora de vários artigos científicos em revistas internacionais e fez parte de vários projetos de investigação.

O livro traduzido conta com 81 páginas, divididas por oito capítulos, cada capítulo explica um pouco mais sobre o tema e em cada um somos levados a saber um pouco mais sobre este tipo de células. De afirmar também que a linguagem existente no livro é altamente especializada, não havendo espaço a explicações muito pormenorizadas sobre os termos constantes no mesmo.

O primeiro capítulo é uma pequena introdução ao tema a abordar no livro.

O segundo capítulo aborda o tema das “células pluripotentes” e encontra-se dividido em dois tópicos, sendo que o primeiro tópico aborda as “células pluripotentes diferenciadas”, tendo um subtópico denominado “rede transcricional da

pluripotência” e um segundo tópico intitulado “rede transcricional e vias de sinalização da pluripotência.

O terceiro capítulo está dividido em dois tópicos, o primeiro aborda o início desta nova aventura da biologia, com a criação da primeira célula estaminal pluripotente induzida e a descoberta dos genes que levam ao retorno da célula madura ao estado pluripotente. O segundo tópico, “reprogramação”, fala-nos da reprogramação das células e contém um subtópico, “fatores de entrega nas células alvo”, que se encontra dividido em cinco subtópicos, a saber, “abordagens de integração”, “abordagens de excisão”, “abordagens não integrativas”, “reprogramação química” e “micro-RNA em reprogramação”.

O quarto capítulo, intitulado “mecanismos moleculares de pluripotência”, está dividido em cinco tópicos. O primeiro aborda os “passos na reprogramação” e neste existem três subtópicos denominado de eventos ou passos chave intermédios, que são: “aumento da taxa de divisão celular”, “mudanças morfológicas” e “eventos tardios para a pluripotência”. O segundo, “mecanismos na reprogramação”, encontra-se dividido em dois subtópicos que são “fatores genéticos” e “vias de sinalização”. O terceiro tópico fala-nos das “dinâmicas da reprogramação direta”, o quarto das “modificações epigenéticas e o quinto e último tópico aborda as “semelhanças e diferenças entre as CEPi e as CEE”.

O quinto capítulo, “modelar doenças num prato”, é composto de cinco tópicos: “CEPi específica de doença”, “escolher a fonte de células”, “identificação de colónias de CEPi”, “caracterização da mutação genética” e “diferenciação das CEPi no tipo de células desejado”.

O sexto capítulo, intitulado “dificuldades para o potencial terapêutico das hCEPi”, encerra somente um tópico cujo título é “a reprogramação é necessária para as terapias regenerativas?”.

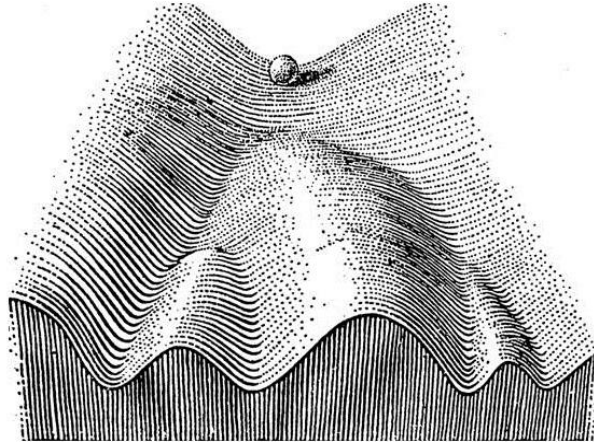
O sétimo e penúltimo capítulo, “nova abordagem para entender a biologia das células estaminais”, contém quatro tópicos: “saúde versus doença”, “mudança de paradigma: reprogramação como um processo raro, mas robusto”, “do reducionismo para a todo” e “mais considerações futuras”.

O último capítulo remete-nos para as conclusões.

O livro também contém algumas imagens, fotografias e tabelas que ajudam a melhor compreender o texto. Nestas podemos dar como exemplo a paisagem

epigenética de Waddington **(a)**, uma fotografia de uma célula segundo a fórmula matemática $z = (z^*c+1) + 1/(z^*c+1)$ **(b)** e tabelas, como no exemplo **(c)**.

Fig. 7.2 Na paisagem de Waddington [da referência Waddington (1957)] a bola representa um ovo fertilizado totipotente. Ele irá diferenciar-se em várias linhagens enquanto a bola rola pelo vale.



(a) Paisagem de Waddington

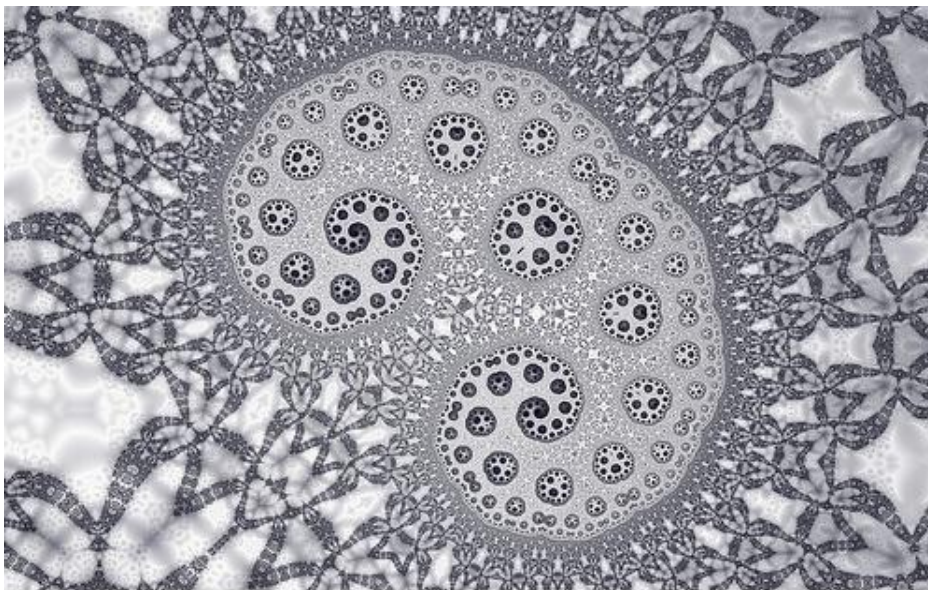


Fig. 7.1 Esta imagem é o resultado da forma fractal do $z = (z^*c+1) + 1/(z^*c+1)$ (Softologyblog, 2011)

(b) Fotografia ilustrativa de uma célula segundo a fórmula fractal $z = (z^*c+1) + 1/(z^*c+1)$

	hCEE	EpiCE	mCEE
Estado de pluripotência	Semelhante à MCI	Semelhante ao epiblasto pós-implantado	Semelhante à MCI
Estado de maturidade	Primed	Primed	Naïve
Morfologia	Monocamada lisa	Monocamada lisa	Em forma de cúpula
Condições de Cultura	Activina A/bFGF	Activina A/bFGF	LIF/BMP4 2i
Estado de confirmação de pluripotência	Formação de teratoma	Formação de teratoma	Completação tetraploide Contribuição da linha germinativa
Inativação do cromossoma X	XaXi	XaXi	XaXa
Sinalização BMP	Induz a diferenciação	Induz a diferenciação	(+LIF) Estabilizado
TGF-B & FGF2	Suporta a renovação	Suporta a renovação	Induz a diferenciação
Via de sinalização ERK 1/2	Requer	Requer	A autorrenovação é reforçada pela inibição

(C) Tabela 1 Diferentes tipos de células pluripotentes e ações antagonistas para as mesmas vias de sinalização, em diferentes estados de pluripotência.

De referir também que esta obra não contém notas de rodapé. No entanto, dispõe de uma bibliografia bastante extensa sobre todos os trabalhos pesquisados para a elaboração desta obra.

Throughout history people have dreamed of finding a Fountain of Youth to escape the consequences of aging and disease, and the ability to return an adult body cell to an embryonic state would certainly appear to be as close as humanity has come to that fantasy so far.

Konrad Hochedlinger

2.2 Células Estaminais Pluripotentes Induzidas

Ao longo da história as pessoas sonharam com a descoberta da Fonte da Juventude, de forma a escaparem às consequências do envelhecimento e das doenças, por isso, e visto estarmos numa época em que a juventude eterna recebe um papel mais importante que a vida eterna, as células estaminais pluripotentes induzidas (CEPi) merecem especial destaque.

Durante 30 anos, com a descoberta das células estaminais embrionárias e da sua pluripotência, capaz de se transformarem em qualquer um dos 220 tipos de células do corpo humano, criou-se a esperança dessas células substituírem células doentes e abriu-se uma discussão que envolve questões éticas. Por esse motivo, os investigadores procuraram outras formas de se obter células estaminais. A partir disso, Shinya Yamanaka, da Universidade de Tokyo, revelou, em Agosto de 2006, que conseguiu através de células da pele de ratos e de um cocktail de genes, transformar células adultas em células estaminais pluripotentes induzidas, com as mesmas características das células estaminais embrionárias.

Tudo começou no ano de 2006, na Universidade de Quioto, pela mão de Shinya Yamanaka e da sua equipa (se formos mais puristas poderemos afirmar que tudo começou não em 2006 mas sim no dia 5 de julho de 1996 com o nascimento do primeiro mamífero clonado artificialmente, a ovelha Dolly). Shinya Yamanaka pegou num cocktail de genes especialmente importantes nas células estaminais e introduziu-os em células adultas usando um retrovírus como veículo de entrega na célula e essas células passaram a um estado semelhante ao das células estaminais. A essas células deu-se o nome de células estaminais pluripotentes

induzidas (CEPi), em inglês *Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)*. Por este avanço científico Shinya Yamanaka foi galardoado, em 2011, com o prémio Wolf da Medicina e, em 2012, com o prémio nobel da medicina.

Desde então e até os dias de hoje os avanços têm sido enormes, desde os primórdios em que foram usados retrovírus como veículo de entrega dos genes nas células, que têm um grande inconveniente do seu ARN se incorporar no ADN no hospedeiro – de forma semelhante ao vírus da sida – até ao uso do retrovírus da gripe humana comum como veículo de entrega dos genes (Oct4, Sox2, Klf4 e c-Myc) nas células, usado por Konrad Hochdinger, pois, segundo ele, usando esse vírus, há menos hipóteses dos seus genes sobreviverem nas células do recetor e gerar mutações que podem originar cancros, ou seja, o mesmo não se incorpora no ADN do hospedeiro e o próprio corpo do recetor é capaz de o eliminar; ou desde o uso de um cocktail de genes naturais até ao uso de genes semelhantes mas de origem sintética, uma vez que, como descrito nos trabalhos de Sheng Ding, do Instituto de Investigação Scripps, e de Douglas A. Melton, de Harvard, cada substância química ativa um caminho de interações moleculares dentro de uma célula que seria ativado pelo gene. Isto evitaria a contaminação da célula pelo agente viral e assim seria possível utilizar estas células em terapias humanas; ou desde a criação das CEPi até à criação de ratos completamente originados a partir das CEPi, ou desde o uso de células de fibroblastos para a transdução até ao uso de simples células da pele. E não termina por aqui pois o futuro ainda está distante e a técnica ainda é muito recente.

Existem imensas vantagens com o uso das CEPi e a maior e talvez principal vantagem destas células é o facto das mesmas terem uma fonte infinita de células para o estudo do mais variado tipo de doenças e, uma vez que qualquer célula pode ser derivada, inclusive as células de pacientes já doentes, não há limite para o que é possível. Outra das grandes vantagens é o poder contornar-se todos os entraves éticos e morais existentes com o uso de células estaminais embrionárias, porque aqui não se trabalha com células de fetos ou do cordão umbilical. Nas grandes vantagens também se pode inserir a criação de “peças sobresselentes” e medicamentos específicos do paciente porque como estes são produzidos a partir das próprias células do paciente, tornando ao mesmo tempo o paciente dador e recetor, não existe o perigo de rejeição imunológica por parte do corpo do doente.

A partir deste trabalho, prevê-se no futuro personalizar os cuidados de saúde, uma vez que todos os tratamentos que um doente necessitar serão desenvolvidos a partir das suas próprias células. Desses tratamentos constam medicamentos cem por cento compatíveis com o doente ou mesmo o desenvolvimento de um órgão, por exemplo um coração, rim, fígado, etc., originado das próprias células do doente, o que levaria a que o doente tivesse uma vida saudável sem a necessidade de recorrer aos tão importantes imunossuppressores que hoje em dia acompanham os doentes transplantados até ao resto das suas vidas.

Porém, antes de qualquer aplicação e qualquer teste clínico, há a questão da segurança da célula. É necessário certificar-se que, num grupo de células geradas a partir de CEPi, como por exemplo, novos neurónios, não haja células que se diferenciem em tumores. Por isso, é de salientar que as técnicas usadas ainda se encontram em fase de desenvolvimento, sendo ainda muito precoce especular-se sobre os reais benefícios para o futuro dos cuidados de saúde, mas a perspetiva é a de que nos próximos anos será descoberta qual a célula que será mais adequada para determinada doença, para garantir a não exposição de pessoas a mais riscos, além das doenças que já possuem.

3. Tradução e critérios de qualidade

Todos os progressos científicos advêm de um somatório de conhecimentos anteriores deixados pelos cientistas do passado. A utilização dos bons termos e do bom registo linguístico é extremamente importante na progressão, manutenção e transmissão do saber. Os comentários pessoais, humorísticos, expressões figuradas e outras facetas de linguagem pessoal são (exceto em texto de divulgação, para um público mais alargado) sistematicamente evitados (Coimbra, 2001).

A propagação de todos os conhecimentos científicos realiza-se também através da tradução.

Segundo Gouadec (2007), muitas pessoas acreditam que traduzir é somente uma questão de “línguas” e que qualquer pessoa que tenha traduzido na escola pode vir a ser um tradutor, sendo isto apoiado pelo simples facto de existirem os tradutores automáticos online, o que leva a que muitas pessoas acreditem que a tradução não é um emprego a sério, porque para se traduzir basta ter-se conhecimentos de uma língua e um bom dicionário e, para essas mesmas pessoas, a tradução é uma simples atividade de traduzir frases e palavras para outra língua.

Gouadec continua dizendo que não é bem assim. Um tradutor é um profissional altamente especializado com conhecimentos tanto ao nível dos conteúdos como das mais variadas ferramentas de tradução assistida. Para o mesmo autor não basta ter-se conhecimentos numa língua:

Languages are essential, but insufficient. What is needed beyond absolute linguistic proficiency is a perfect knowledge of the relevant cultural, technical, legal, commercial backgrounds, and a full understanding of the subject matter involved. (Gouadec, 2007: XIII)

Um tradutor tem que ter, entre outras competências, a competência de compreender, interpretar e encontrar a metodologia de tradução adequada ao texto

que tem entre mãos para traduzir. Neste caso, um texto científico tem características que um tradutor tem que ter sempre em mente e respeitar no momento da tradução, nomeadamente:

- impessoalidade;
- objetividade;
- estilo científico (linguagem informativa, de ordem racional, firmada em dados concretos);
- vocabulário técnico (cada ramo científico tem a sua própria terminologia);
- correção gramatical (clareza e precisão das ideias);
- recursos ilustrativos (tabelas, desenhos, fotografias).

Garantir a qualidade de uma tradução é o objetivo de qualquer tradutor. A qualidade de uma tradução é atingida através de vários fatores que se prendem com a formação do tradutor e com a garantia de que este utiliza os procedimentos adequados.

Atualmente, os tradutores devem ter habilitações necessárias para trabalhar como tradutor (licenciatura ou pós-graduação), ter conhecimentos linguísticos alargados, ter uma formação ou conhecimentos especializados em áreas específicas e ainda possuir as ferramentas de tradução adequadas.

Todas estas habilitações e outras estão presentes na EN15038, Norma Europeia de Qualidade para Serviços de Tradução, que entrou em vigor em 2006. A norma é assim citada no sítio da empresa tradução Tecnilínguas¹:

O objetivo da norma é estabelecer e definir os requisitos para a prestação de serviços de tradução de qualidade.

São compreendidas todas as fases do processo de tradução, sendo que a garantia da qualidade e a capacidade de registo da sua evolução são pontos vitais desta Norma, que define todo o processo aos Prestadores de Serviços de Tradução e aos seus clientes e providencia aos primeiros procedimentos e requisitos normalizados que visam satisfazer as exigências do mercado, incluindo recursos humanos e técnicos, gestão da qualidade e de projetos,

¹ C.f. <http://www.tecnilingua.pt/pt/noticias/go/norma-europeia-de-qualidade-para-servicos-de-traducao>

contexto contratual, procedimentos, serviços de valor acrescentado e definições de termos.

Hoje em dia, as traduções passam por um controlo de qualidade totalmente diferente do processo tradicional que consistia numa simples verificação gramatical e ortográfica. Tal como Miriam Santos afirma:

O processo de qualidade é orientado para o cliente e o produto. O utilizador e a funcionalidade são fatores-chave nesse controlo (Santos, 2008)

Embora seja argumentado que a qualidade em tradução é subjetiva, existem, no entanto, certos critérios para efetuar um serviço de qualidade. O sítio da empresa de tradução Veritas (Veja-se “Veritas Traducción y Comunicación, S.L..Disponível em: <http://www.veritaseuropa.com/traducoes/portugues/qualidade.htm>) cita esses critérios da seguinte maneira:

- A correta transferência do conteúdo do texto de origem para o texto de destino.

- A correta escolha de aspetos fundamentais como terminologia, vocabulário, gírias, expressões, tecnicismos e linguagens específicas de cada sector e profissão no idioma de destino.

- O uso adequado da gramática, ortografia, pontuação e sintaxe, assim como a correta transcrição de datas, nomes, dados etc. no idioma de destino.

- A adequação do estilo e formas da linguagem às finalidades do texto e à intenção do seu autor.

Ainda há certos fatores que influenciam a qualidade da tradução.

- **A perícia, o conhecimento e a língua materna do tradutor:** ter um excelente conhecimento da língua para a qual vai traduzir.

- **Revisão e correção:** É aconselhável que o revisor não seja o tradutor original, de forma a ter uma perspetiva diferente sobre a tradução.

- **Prazo de entrega:** Um trabalho feito à pressa raramente é um trabalho bem feito. É preciso saber gerir o seu tempo e conhecer as suas competências de forma a avaliar a duração de um projeto.

- **Grau de comunicação entre o tradutor e o cliente:** O contacto do tradutor com o cliente é muito importante, pois garante um melhor resultado final. A opinião do cliente é fundamental relativamente a vários aspetos, nomeadamente, formatação final do texto, terminologia ou ainda à paginação do documento.

Após isto, é necessário referir que para este trabalho não foi necessário respeitar-se todos os critérios de qualidade descritos em cima. Para começar, este é um texto traduzido no âmbito do mestrado em tradução especializada, pelo que não existia um cliente. A ausência de cliente fez com que o tradutor não tivesse que respeitar este critério. Outro ponto que foi abordado muito ligeiramente foi o da revisão e correção. Segundo a empresa Veritas, a revisão deve ser feita por alguém que não o próprio tradutor, mas neste caso, tratando-se este de um trabalho pessoal para obtenção do grau de mestre, a revisão e a correção têm obrigatoriamente de partir do próprio candidato a esse grau, embora o mesmo tenha sido orientado por uma professora com experiência na área.

O prazo de entrega foi um dos pontos a ter em conta devido à extensão do livro traduzido e de todo o trabalho envolvido no mesmo, nomeadamente a elaboração de base de dados. Aqui existiam duas possibilidades, a entrega na primeira fase ou segunda. Inicialmente foi pensada a primeira, mas a tradução e base de dados levaram mais tempo do que o necessário, deixando pouco tempo para o relatório. Como tal optou-se pela segunda fase, o que fez com que o prazo para a elaboração do mesmo fosse aumentado em alguns meses.

Um dos pontos importantes foi o conhecimento das línguas com que se ia trabalhar. Aqui optou-se por uma tradução de inglês para português devido às competências técnicas do tradutor na língua de chegada, a mesma que a língua materna.

Outro ponto bastante importante foi a correta compreensão do tipo de texto que se ia traduzir, pois o mesmo iria influenciar toda a tradução.

Também é necessário referir a terminologia existente neste texto. Sendo a terminologia um aspeto muito sensível nesta tradução foi necessário recorrer-se a

sítios fiáveis e cuja identidade fosse reconhecida. Neste ponto foi difícil encontrar um sítio na internet que tivesse toda a informação, pelo que se optou por vários sítios, tendo sempre em mente que os mesmos teriam de ser fiáveis e elaborados por pessoas com competências na área.

4. Público-alvo

Sendo a editora do livro, a Springer, uma editora que tem o intuito de fornecer informação de qualidade à comunidade científica internacional – isto mesmo poderá ser visto no próprio sítio da internet da editora, onde na sua declaração de missão se escreve “Throughout the world, we provide scientific and professional communities with superior specialist information.” – pode-se depreender, só por isso, que o público-alvo deste livro é muito restrito.

Neste caso, o público-alvo são profissionais do ramo da área da investigação celular, mas nestes também se poderão incluir os estudantes de biologia celular já com alguns conhecimentos na área ou que estejam agora a entrar nos estudos genéticos. Neste mesmo público, e uma vez que a autora da obra é especializada em medicina dentária, podemos inserir os médicos odontologistas que queiram saber um pouco mais sobre aquilo que o futuro lhes reserva nesta área. Também poderemos incluir alguns médicos que, não tendo propriamente grandes conhecimentos na matéria mas sendo de áreas que lidam diariamente com doenças crónicas, como por exemplo o cancro ou doenças neurológicas, querem estar informados sobre o futuro da medicina, uma vez que os estudos levados a cabo irão no futuro servir quase exclusivamente a área da saúde e bem-estar.

Sendo esta uma obra muito específica que, no entanto, também se destina ao público-alvo menos especializado sobre o assunto, como referido acima, convém haver uma tradução da obra para uma melhor compreensão do assunto aqui abordado. Sem esta tradução, o público menos especializado e, acima de tudo, não muito familiarizado com a língua inglesa poderia ter muitas dificuldades na sua compreensão. Esta tradução é também importante porque a grande maioria dos textos científicos, artigos, livros, etc. se encontram escritos em inglês, não havendo muitas publicações na área escritas na língua portuguesa.

Os termos técnicos vêm desprovidos de qualquer explicação e/ou definição, o que nos leva a crer que a obra está centrada no público-alvo acima referido. Esta obra tem um carácter informativo e científico, abordando o tema desde o seu início,

em 2006, sendo que aborda o presente da investigação e deixa-nos algumas pistas, nomeadamente sobre algumas doenças que, não tendo neste momento perspectivas de cura, no futuro podem vir a ser curadas ou apaziguadas pelo uso destas células.

Sendo esta uma editora especializada só se pode esperar que todos os textos, obras, artigos, etc. sejam escritos por especialistas na área e esta obra não foge à regra. A autora, embora seja da área da medicina dentária, tem um doutoramento na área de estudos abordada e os seus trabalhos são reconhecidos pela comunidade internacional, sendo também autora de muitos outros artigos publicados em revistas de renome, como o IJOS (International Journal of Oral Science). É também membro do conselho editorial do NICHE (Journal of Cellular Therapy and Regenerative Medicine).

Esta obra pretende mostrar aos seus leitores a evolução dos estudos sobre as células estaminais pluripotentes induzidas, podendo mesmo ser um bom ponto de partida para o conhecimento ou aprofundamento sobre este tema.

5. Análise e caracterização do documento.

Nesta parte analisar-se-á o livro utilizado para a tradução, de forma a caracterizar a sua tipologia e género textual, assim como a sua estrutura e linguagem, por outras palavras, este capítulo servirá para analisar a macroestrutura e microestrutura do texto trabalhado.

5.1 Tipologia textual

É muito importante para o tradutor definir a tipologia do texto que vai traduzir, uma vez que todo o trabalho desenvolvido será influenciado por essa mesma tipologia. Como Reiss sugeriu: “the most important invariant in translation is the text type to which the source text belongs, as it determines all other choices a translator has to make” (apud Baker, 2008: 198).

Sendo este um texto científico o mesmo reveste-se de um carácter informativo e técnico, para tal o mesmo tem de ser escrito por alguém que perceba da matéria, pois não é qualquer autor que escreve sobre um tema destes sem ter conhecimentos profundos do mesmo.

Macroestrutura

Tendo este livro sido publicado por uma editora de renome internacional, a obra segue todas as regras a que a editora obriga. Estas mesmas regras podem ser encontradas no sítio de internet da editora www.springer.com. Contudo, muitas destas regras da editora correspondem ao mesmo tempo às regras existentes neste tipo de textos científicos. Para começar, a mancha gráfica é corrida, sendo apenas interrompida por capítulos e subcapítulos. No caso deste livro, para os capítulos existe um título, seguido dos vários subtítulos dos vários subcapítulos. Esta mancha gráfica é comum a este tipo de livros científicos.

O texto científico apresenta diferenças em relação aos demais tipos de textos. Para começar é um texto escrito, de natureza impessoal, que utiliza um estilo muito característico do texto científico. Isto é, visa suscitar o afastamento do sujeito que escreve, de forma a garantir objetividade, comum nestes tipos de textos. As ideias são claras mas apresentadas numa linguagem muito técnica com poucas explicações e com bastantes termos científicos, em muitos casos, só compreendidos por um leitor muito especializado.

Este tipo de texto visa o trabalho realizado, contando sempre com uma introdução, os materiais e métodos utilizados, terminado com os resultados obtidos, a discussão desses mesmos resultados e a conclusão.

O mesmo começa com uma pequena introdução, que se encontra dividida em quatro partes. Essas partes visam contextualizar todo o trabalho desenvolvido durante as pesquisas efetuadas, dar a conhecer ao leitor todos os conceitos que se abordam no trabalho, levar o leitor a interessar-se pelo tema abordado no trabalho e finalmente apresentar os objetivos do estudo.

É nos materiais e nos métodos de trabalho que o autor aborda o tema em questão, mostrando como chegou ao resultado atingido, ao mesmo tempo que fornece ao leitor todos os dados da sua investigação para que o estudo possa ser credível aos olhos do leitor. Nesta secção do texto, o autor pretende que o leitor compreenda todo o trabalho desenvolvido durante as suas pesquisas, de forma a que quem lê o seu trabalho possa analisar os resultados que se obtiveram durante a investigação e, quem sabe, no futuro possa reproduzir esse mesmo estudo.

Para facilitar esse trabalho ao leitor, o autor deve mencionar no seu trabalho todos os elementos de pesquisa, externos e internos, sendo que nos externos terão de ser mencionadas todas as pesquisas que o autor desenvolveu, referindo para tal as fontes às quais recorreu para levar a cabo o seu trabalho, e nos internos devem ser mencionadas as condições em que foi realizado o trabalho, os passos que se tiveram em conta durante a realização da investigação e as metodologias utilizadas durante a mesma.

Na parte dos resultados devem estar bem claras todas as informações novas que se obtiveram durante a condução da investigação, de forma a que se possam tirar conclusões sobre o trabalho realizado. Os resultados devem ser apresentados de forma clara e, para tal, existem várias formas de os apresentar. Aqui inserem-se

os elementos não verbais, quer seja por uso de gráficos, esquemas ou tabelas. Ainda nesta área convém ter-se em atenção que os dados incluídos terão de estar relacionados com a pesquisa efetuada, deixando de lado toda e qualquer informação irrelevante para a pesquisa. É também importante expor-se estes dados de forma ordenada, a fim de haver um encadeamento de ideias que não confunda o leitor e que lhe permita obter as mesmas ou semelhantes conclusões que o autor.

Posto isto entra-se na parte da discussão, onde os resultados serão interpretados, sendo muito importante haver uma relação e encadeamento lógico dos mesmos. Para finalizar terá de haver uma comparação com os conhecimentos adquiridos, pelo autor ou outros autores, sem nunca esquecer a parte crítica a que um trabalho científico está obrigado.

Por fim, nas conclusões, deve-se resumir todos os avanços alcançados com a pesquisa efetuada, havendo espaço para lançar o debate sobre o que foi descoberto ou alcançado com o trabalho, deixando sempre espaço à crítica por parte dos pares.

De forma a explicar ainda melhor o tema tratado, podemos encontrar na obra as mais variadas imagens, sendo algumas fotografias e outras desenhos e tabelas. Tratando-se este de um texto científico também se encontram bastantes citações de outros trabalhos realizados por outros investigadores. Trabalhos aos quais a autora recorreu para a elaboração desta obra. Encontram-se também partes de livros, entre eles um do ano 1993, denominado *The god particle*, de Leon Lederman e Dick Teresi, outro de 1982, *The Fractal Geometry of Nature*, de Benoit Mandelbroth e por último, um livro de 1996, *How the Leopard Changed Its Spots*, de Brian Goodwin. Nos esquemas podemos encontrar, por exemplo, o “processo de reprogramação na polpa das células dentárias” e todos os passos por que passa uma célula desde a sua inoculação até à sua caracterização, diferenciação *in vitro* e *in vivo*; nos desenhos encontra-se, entre outros, a paisagem de Waddington, cuja bola representa um ovo totipotente fertilizado que se irá diferenciar em várias linhagens; e nas fotografias podemos encontrar imagens de microscópio de várias células. Estas imagens, fotografias e tabelas ajudam a compreender melhor o texto e são acompanhadas de legendas explicativas. Estas legendas variam de dimensão, sendo que na sua maioria ocupam uma ou duas linhas de texto, embora no sétimo

capítulo as figuras venham acompanhadas de legendas mais elaboradas, de maneira a explicar os processos por elas abordadas.

Para terminar temos a parte pós-textual, onde se pode encontrar a bibliografia e um índice remissivo. A bibliografia aparece no fim de cada capítulo ao invés de aparecer no fim do livro e está organizada por ordem alfabética, neste caso, pelo apelido do autor, e o índice remissivo, também organizado por ordem alfabética, permite-nos encontrar, por via de alguns termos específicos, em que páginas esses mesmos termos são abordados. Nesta obra não se encontram anexos ou apêndices que completem o tema tratado. De referir também que esta obra não contém notas de rodapé.

Microestrutura

Na parte referente à microestrutura, iremos analisar um pouco mais a obra traduzida e serão mencionadas algumas características da mesma.

Sendo este um texto científico, segue as regras para elaboração do mesmo, tanto a nível da linguagem de textos deste género como das exigências por parte da editora.

O texto tem uma escrita formal, as frases são bastante longas, o que contraria as características dos textos escritos em inglês, mas que é normal neste tipo de textos científicos. As frases apresentam alguma dificuldade, não devido ao inglês, mas sim devido à existência de termos complexos, que muitas vezes levam o leitor a ter de reler a frase para a melhor compreender. Esses termos complexos são em muitos casos nomes científicos de certo elemento, que são expressos por via de siglas ou acrónimos, ou que devido ao carácter do texto são escritos usando a nomenclatura internacional que não pode ser expressa pela escrita mas sim por fórmulas. Em a) podemos ver um exemplo de uma frase onde se empregam nomes científicos e em b) temos um exemplo da nomenclatura internacional. No entanto, este texto não emprega só frases longas, existindo algumas frases mais curtas, sendo que muitas vezes estas são frases afirmativas, como nos exemplos c) e d).

- a) *A virus-free method utilizing oriP/EBNA1 (Epstein-Barr nuclear antigen-1)-based episomal vectors or a piggyBac (PB)-based single vector*

reprogramming system has been used successfully for reprogramming human fibroblasts (Kaji et al. 2009; Yu et al. 2009).

Um método livre de vírus, utilizando vetores episomais baseados no oriP/EBNA1 (Epstein-Barr antígeno nuclear 1) ou um sistema de reprogramação de vetores singulares baseados no *piggyBac* (PB) têm sido usados com sucesso para reprogramar fibroblastos humanos (Kaji et al., 2009; Yu et al., 2009).

- b) *A downstream effector of the Wnt pathway, an inhibitor of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) called 6-bromindirubin-3'-oxime or BIO, has been shown to maintain pluripotency in human and mouse ESCs (Sato et al. 2004).*

Um efetor *downstream* da via Wnt, um inibidor da cinase-3 da síntese do glicogénio (GSK3), chamada de 6-bromindirubin-3'-oxime ou BIO, revelaram-se capazes de manter a pluripotência em CEE humanas e de rato (Sato et al., 2004).

- c) *The generation of patient/disease-specific iPSCs follows standard methods.*

A geração de CEPi específicas de paciente/doença segue métodos *standards*.

- d) *In a metazoan body all cells possess the same set of genes.*

Num metazoário todas as células possuem o mesmo conjunto de genes

Devido à sua escrita e ao seu carácter científico, este livro pode não ser completamente compreendido por pessoas que não tenham, pelo menos, alguns conhecimentos nesta área. O vocabulário e a terminologia existentes na obra são bastante específicos, pois a autora escreve para os seus pares e por isso não se preocupa em explicar ao mínimo detalhe o que escreve, como poderemos ver no exemplo que se segue:

- a) *Candidates for the epigenetic modifications in de-differentiation process from somatic cells to iPSCs are promoter CpG DNA methylation, and alteration in histone modifications in relation with this importance of CpG mediated repression of genes.*

Os candidatos para as modificações epigenéticas, no processo da desdiferenciação das células somáticas para CEPi são o promotor CpG da metilação do ADN e a alteração nas modificações das histonas em relação com a importância da repressão dos genes mediada pelo DGP.

Grupos nominais

Começaremos com os grupos nominais, muito presentes nos textos de língua inglesa, e que muitas vezes levantam problemas na tradução. Não se trata somente de uma tradução palavra a palavra, é necessário perceber a ideia que se encontra subjacente, a fim de se poder fazer uma tradução o mais correta possível e que se encontre adequada à língua para a qual se está a traduzir, neste caso, a língua portuguesa. A estes problemas, aquando da tradução destes grupos, acresce o facto de na língua inglesa existir ambiguidade no género, masculino e feminino, tornando-se a sua compreensão ainda mais complicada se a isto adicionarmos a tecnicidade da linguagem deste tipo de textos. No exemplo que se segue podemos ver uma unidade de sentido constituída por 6 palavras gráficas que se encontram justapostas ***lentivirus-contained transcription factors expression cassette***, que, no entanto, podem existir isoladamente: *Lentivirus contained; transcription factors e expression cassette*. Neste caso temos de pegar nestas três expressões, que na versão inglesa não estão unidas por qualquer advérbio ou preposição, mas no caso do português é necessário inseri-las para que a mensagem tenha sentido.

- a) “*Since the primary cells are induced by a **lentivirus-contained transcription factors expression cassette** under the control of the Dox-inducible operator, ‘secondary’ iPSCs formation are triggered when they are cultured in doxycycline-containing media (Maherali et al., 2008; Wernig et al. 2008)*”

Uma vez que as células primárias são induzidas por um **lentivírus contido numa cassette de expressão de fatores de transcrição**, sob o controlo do

operador induzível Dox, a formação de CEPi “secundárias” é desencadeado quando elas são cultivadas num meio contendo *doxycycline* (Maherali *et al.*, 2008; Wernig *et al.* 2008).

De referir também que existem diferenças na ordem das palavras entre a língua inglesa e a portuguesa. Se em português a frase é escrita de forma a respeitar a ordem substantivo-adjetivo, em inglês existe uma inversão desta ordem, passando a ser adjetivo-substantivo. Neste ponto podemos referir o seguinte exemplo:

a) *“Today many fundamental systems in biology are changing to accept that **mature body cells** could be reverted to na embryonic state without the help of eggs or embryos.”*

“Hoje em dia, muitos sistemas fundamentais em Biologia estão a mudar, para aceitar que as **células maduras do corpo** podem ser revertidas para um estado embrionário sem a ajuda de óvulos ou embriões.”

Sintaxe

Quando a mensagem é emitida, o emissor procura transmitir algo que seja compreendido. Para isso, as palavras são relacionadas e combinadas entre si. A sintaxe é um instrumento essencial para o manuseio satisfatório das múltiplas possibilidades que existem para combinar palavras e orações. Na língua inglesa, neste caso concreto, neste texto científico, é recorrente o uso da voz passiva, mas na língua portuguesa a mesma é muitas vezes substituída por formas concorrentes, formas impessoais. É necessário nestes casos não utilizar em demasia a voz passiva quando se traduz para o português, optando-se preferencialmente pelo uso de formas impessoais com “se” – faz-se, diz-se, etc. , de modo a tornar o discurso mais fácil e claro de entender. Em relação à voz passiva segue-se o seguinte exemplo.

a- **“It has been shown** that reprogramming in heterokaryons was influenced by DNA methylation status, tissue of origin and relative ratio of

nuclei that dictates the balance of regulators (Blau and Baltimore 1991; Zhang et al. 2007).”

“**Mostrou-se** que a reprogramação em heterocários foi influenciada pelo estado de metilação do ADN, pelo tecido de origem e pelo rácio relativo dos núcleos, que ditam o balanço dos reguladores (Blau e Baltimore 1991; Zhang *et al.* 2007).”

Os conetores são bastante frequentes no texto científico e marcam a coesão interfrásica. Isto acontece porque o mesmo não é um texto fechado, há sempre algo mais a dizer, sem nunca se esquecer que os conectores estabelecem as relações semânticas entre as frases. Aqui iremos dar alguns exemplos de alguns conectores existentes no texto de partida. Entre eles, como exemplo, encontramos os seguintes, adição (a), conclusão (b), confirmação (c), contraste (d) e de sequência temporal (e). Em baixo seguem alguns exemplos e a respetiva tradução.

a – “**On the other hand**, Nichols and Smith designated pluripotent cells as *na* and *primed* according to their maturity state of pluripotency (Nichols and Smith 2009).”

“**Por outro lado**, Nichols e Smith designaram as células pluripotentes como *na* e *primed*, de acordo com o seu estado de pluripotência (Nichols e Smith 2009).”

b – “**In conclusion**, as Meissner stated, the identification of putative enhancers, miRNAs, and large intergenetic non-coding (*linc*) RNAs may help us to gain further insights into the transcriptional regulation and the role of epigenetic modifications (Meissner 2010).”

“**Em conclusão**, como afirmou Meissner, a identificação de potenciadores putativos, miRNAs e ARN de *large intergenic non-coding (linc)* pode ajudar-nos a adquirir conhecimentos mais profundos para a regulação transcricional e o papel das modificações epigenéticas (Meissner, 2010).”

c – “**In fact**, the retroviral vector can infect over 90% of fibroblasts, however only a small number of iPSC colonies emerged with the efficiency of 0.001%.”

“**De facto**, o vetor retroviral pode infetar mais de 90% dos fibroblastos, no entanto, somente um pequeno número de colónias de CEPi emergiram com uma eficiência de 0,001%.”

d – “Interestingly, hESCs share defining features with EpiSCs, **yet** are derived from preimplantation human embryos (Nichols and Smith 2009) (Table 1).”

“Curiosamente, as hESCs partilham características definidoras com as EpiSCs, **no entanto** derivam de embriões humanos pré-implantados (Nichols e Smith 2009) (Tabela 1).”

e – “**Soon after**, with the improved end points for the for the reprogramming process such as using Nanog or Oct4 as selector, instead of Fbxo15, they generated colonies with reactivated pluripotency genes, and these cells were also similar to ESCs and could contribute to adult chimeras (Okita et al. 2007).”

“**Logo depois**, com o melhoramento dos pontos finais para o processo de reprogramação, tais como a utilização do Nanog ou Oct4 como seletores, em vez do Fbxo15, eles geraram colónias com genes de pluripotência reativados, e estas células eram também semelhantes às CEE e podiam contribuir para quimeras adultas (Okita *et al.*, 2007).”

Tempos verbais

O discurso desta obra recorre a vários tempos verbais, porque, como referido acima, a mesma mostra-nos um pouco sobre a evolução desta área de estudos desde que se clonou a ovelha Dolly, passando pelos dias de hoje, e aborda também aquilo que esta investigação nos poderá vir a dar no futuro. No entanto, existe uma maior predominância dos verbos do passado, existindo também verbos no presente. Em relação aos verbos no passado é de referir que, devido ao facto da autora citar

vários estudos de outros autores, é comum encontrar expressões como: *have recently showed, it has been demonstrated, have demonstrated, showed, reported, were generated*. De mencionar que, como habitual no texto científico, a grande maioria dos verbos se encontram na forma impessoal ou na terceira pessoa do plural – *considerable research effort has been exerted to; there have been considerable efforts to*. Em baixo podemos encontrar alguns exemplos dos verbos acima mencionados, como por exemplo: passado (a) e presente (b) . De referir que em (c) se encontra uma das raras exceções em que foi encontrado um verbo no futuro.

a- “Although changing a somatic cell **was achieved** using frog oocytes, somatic cell nuclear transfer (NT) could not be succeeded in other species until late 1990s. Then Wilmut et al. (1997) **cloned** sheep Dolly. The first successful derivation of humans ESCs was reported a year after (Thomson et al. 1998).”

“Embora a alteração do destino da célula somática **tivesse sido alcançada**, usando os oócitos de rã, a transferência nuclear das células somáticas não pôde ser bem-sucedida em outros animais até finais dos anos 90. Nessa altura, Wilmut *et al.* (1997) **clonaram** a ovelha Dolly. A primeira derivação bem sucedida das CEE humanas foi reportada um ano depois (Thomson *et al.* 1998).”

b – “In general, induced pluripotent somatic cell reprogramming **is** an inefficient process even when different strategies are used. There **is** a latency of approximately 5-10 days before the first iPSCs appears. This delay and the low efficiency **are** indicators of stochastic mechanisms involved in inducing reprogramming (Hanna et al. 2009)”

“No geral, a reprogramação das células somáticas pluripotentes induzidas **é** um processo ineficiente mesmo quando se usam estratégias diferentes. **Existe** uma latência de aproximadamente 5 a 10 dias antes da primeira CEPi aparecer. Este atraso e a baixa eficiência **são** indicadores de que estão envolvidos mecanismos estocásticos na indução da reprogramação (Hann *et al.*, 2009).”

c – “The generation of *na* hESCs **will allow creating** new opportunities for patient-specific researches. On the other hand, Guo et al. (2009) examined interconversion between mESCs and EpiSCs.”

“A geração de hESCs *na* **permitirá criar** novas oportunidades de investigações específicas para cada paciente. Por outro lado, Guo *et al.* (2009) examinaram a interconversão entre as mESCs e as EpiSCs.”

Frases interrogativas

Convém também dedicar algum tempo a analisar os tipos de frases existentes no texto de partida e como as abordar no texto de chegada. Estando nós a lidar com um texto científico, de carácter argumentativo, onde o objetivo é informar as pessoas sobre o trabalho desenvolvido, é essencial escolher-se bem as frases a usar no mesmo, de modo a que o leitor não perca o fio à meada ou mesmo o interesse na sua leitura.

Para que isso seja possível é necessário recorrer aos mais variados recursos gramaticais. Nestes recursos temos de incluir as frases interrogativas, de forma a manter o leitor interessado no tema. Ao longo do texto encontramos algumas vezes este tipo de frases, como pode ser visto abaixo:

- “Would it be possible to engineer such a cell layer by layer? Would it be possible to explain all the events of all levels of that construction by the help of fundamental mathematics and physics?”

Seria possível construir tais células camada a camada? Seria possível explicar todos os eventos de todos os níveis dessa construção, através da ajuda da matemática e da física fundamental?

Siglas e acrónimos

A existência de inúmeras siglas e acrónimos é uma das características do texto científico, pelo que este não foge à regra. No caso específico do texto

traduzido, estas siglas/acrónimos raramente aparecem explicadas, o que vem provar que este texto se destina a um público-alvo muito específico, contrariamente aos textos de divulgação científica, muitas vezes encontrados em revistas, com o intuito de informar.

Neste caso concreto, a raridade com que as siglas/acrónimos são explicadas levou a que muitas vezes fosse só necessário efetuar pesquisas para ver se havia equivalência no português europeu. Em certos casos não havia equivalência, pelo que se decidiu manter a sigla na língua de partida, como exemplo podemos encontrar *oct* e *VPA*. Temos também o caso das siglas/acrónimos para os quais existe tradução da expressão mas cuja sigla é comum em ambas as línguas:

VPA – ácido valpróico (pt) e *valproic acid* (en);

AFP – a fetoproteína (pt) e *a-fetoprotein* (en).

Houve outras em que havia correspondentes em ambas as línguas, tanto para a sigla como para a expressão: *Graft-versus-host disease* (*GVHD*) e em português é Doença do enxerto contra hospedeiro (DEcH).

Houve também casos em que, após efetuadas algumas pesquisas, foi possível encontrar um equivalente para alguns elementos constituintes da sigla, mas na sua totalidade era impossível a sua tradução de forma credível e por isso optou-se por manter a sigla igual tanto na língua de chegada como na de partida. Neste caso podemos referir a mESCs (*Mouse ESCs*). Aqui podemos ver que a sigla *ESC* (*embryonic stem cell*) tem tradução para português como CEE (célula estaminal embrionária), no entanto, quando há uma pequena mudança na sigla e a esta se adiciona o *m* de *mouse* foi decidido que não se iria traduzir para “mCEE”, embora o “m” possa ser equivalente com “murino”.

Numerais

No caso dos numerais houve algumas decisões a serem tomadas durante a tradução. Nesta situação engloba-se o uso do ponto ou da vírgula cada vez que aparece um número separado pelas mesmas. Se em inglês os números inteiros são separados dos números decimais por ponto, no caso da língua portuguesa o mesmo

não se aplica. É nestes casos necessário mudar para uma vírgula. Aqui podemos dar como exemplo as percentagens:

- “The efficiency of iPSCs generation using MMLV-derived retroviruses is ~0.1% in mouse embryonic fibroblasts and ~0.01% in human fibroblasts (Gonzalez et al. 2011).”

“A eficiência da geração das CEPi usando retrovírus derivados da MMLV é de ~0,1%, em fibroblastos embrionários de ratinhos, e de ~0,01%, em fibroblastos humanos (Gonzalez *et al.*, 2011).”

Como se pode ver nos exemplos acima constata-se o que foi referido. O ponto, no texto de partida, foi substituído pela vírgula.

6. Metodologia de tradução

Neste capítulo, abordar-se-ão diversas temáticas tais como o processo de tradução, os recursos utilizados na realização da tradução e, no último ponto, a revisão do texto de chegada (pós-tradução).

Cada tradutor recorre a uma determinada metodologia de tradução, consoante o género e a função predominante no texto, e é essa mesma metodologia que em parte definirá a qualidade do texto de chegada. Mas, acima de tudo, é necessário ter-se conhecimentos na área do texto que se pretende traduzir. No entanto, quando o tradutor não tem grandes conhecimentos na área torna-se ainda mais importante toda a fase de pré-tradução do texto. Esta fase de pré-tradução irá influenciar toda a fase da tradução. Gouadec (2007) estabelece três fases no processo de tradução: pré-tradução, tradução e pós-tradução.

6.1 Processo de tradução

Gouadec defende que o processo de tradução está dividido em três fases: pré-tradução, tradução e pós-tradução. Aqui iremos abordar um pouco destes processos, sem nunca esquecer o trabalho realizado.

6.1.1 Pré-Tradução

Pre-translation includes all the groundwork leading up to the translation itself; *i.e.* understanding the source document, finding all the relevant information as well as the terminology and phraseology and translation memories needed to carry out the translation, and making the source material ready for translation. (Gouadec, 2007: 20)

Como referido acima, e após várias pesquisas sobre obras referentes ao tema abordado, o livro trabalhado neste projeto de mestrado foi adquirido em versão de papel no sítio web da amazon.com.

A primeira parte deste processo de tradução foi ler o livro, o que foi feito usando a versão papel, mas aquando do momento da tradução isso tornou-se um inconveniente pois o tradutor tinha de desviar os olhos do ecrã e por conseguinte da tradução para ler o texto de partida. Por este motivo optou-se pela digitalização do livro, seguido da sua formatação para *pdf*. Procedeu-se assim para todos os capítulos menos para os dois primeiros, uma vez que esses se encontram disponíveis na internet para *download*, no sítio web da editora.

O segundo passo foi pesquisar os mais variados tipos de textos paralelos sobre o tema genética. Como a quantidade de textos na língua de partida era imensa, foi necessário fazer-se uma seleção dos mesmos. Para essa seleção começou-se por, primeiro, escolher os mais recentes, segundo, desses mais recentes só se leram aqueles que pertenciam aos autores mais consagrados no tema. De dizer que devido à dificuldade de muitos desses textos, optou por se dar primazia àqueles que estavam mais voltados para um público menos conhecedor na matéria, ou seja, textos com um público-alvo maior. Em relação aos textos em português, só se leram textos para um público-alvo abrangente, pois não existem textos mais complexos/desenvolvidos escritos em português europeu.

O terceiro passo foi a extração terminológica e inserção desses termos extraídos na base de dados. Após a inserção dos termos na base de dados começou-se a completar todos os parâmetros estabelecidos para a base de dados: termo, definição, fonte, sigla e sinónimo, isto para ambas as línguas.

6.1.2 Tradução

“The transfer task is, of course, central to the translating process and it is what all ‘translators’ carry out. Transfer normally means transferring contents and meaning into a different culture, a different code (linguistic or other), a different communicative set-up, for an audience or users who are different, though homologous, making all necessary adaptations to that effect and purpose.

Transfer normally includes self-checks and controls by the translator himself.”
(Gouadec, 2007: 23)

O quarto passo foi a tradução do texto de partida para português. Neste ponto não houve propriamente metas ou objetivos quanto à quantidade que se traduzia diariamente, deixando o tradutor levar-se, acima de tudo, pela sua própria vontade de tradução. A tradução, muito devido à sua dificuldade, levou cerca de dois meses e meio a ficar acabada.

Após este último passo, passou-se à revisão do texto, a primeira revisão foi um pouco superficial. Seguidamente houve necessidade de se reler o texto de partida para ver se havia alguma frase que não fora devidamente percebida, e voltou-se ao texto de chegada para uma ou outra mudança.

De dizer que durante a tradução não foi usada nenhuma memória de tradução (TRADOS, MemoQ, etc.) porque, como o ficheiro estava em formato de papel, haveria necessidade de se inserir o texto de partida palavra a palavra nessa memória, o que obrigaria a um grande dispêndio de horas de trabalho tão necessárias à tradução em si.

A base de dados foi de extrema utilidade pois permitiu não só uma elevada coerência na tradução, mas também porque como já estava terminada permitiu ao tradutor despender o seu tempo exclusivamente na tradução em si.

6.2 Os recursos utilizados na tradução

Uma parte fundamental da vida de um tradutor são os recursos de que ele dispõe no momento de pegar num texto para traduzir. Estes são muito importantes porque são eles que ajudam o tradutor a melhor perceber o texto, uma palavra, uma expressão, uma imagem, ou seja, tudo aquilo com que o tradutor se possa deparar aquando de passar a mensagem para a língua de chegada. Estes recursos são muito variados: livros, artigos, imagens, legendas, vídeos, tudo pode ser usado como apoio ao tradutor. No entanto, estes podem muitas vezes dificultar a tarefa do tradutor, caso a fonte de onde são retirados não seja credível. É importante, talvez

mesmo o mais importante, utilizar somente fontes fiáveis, em especial de institutos ou empresas que lidam diariamente com o tema. Nunca se deve ir por algo que se encontrou ao acaso, embora muitas vezes sejam estes acasos que nos levem a encontrar aquilo de que se necessita. Estes acasos devem ser sempre vistos como um passo em direção à certeza, ao que se possa comprovar, e nunca como ponto final da pesquisa.

São estas fontes que asseguram a qualidade da tradução. Ter uma boa fonte é quase sempre uma garantia de que o que foi feito não pode ser questionado por outros, e caso o seja, certamente nunca o será na sua totalidade. Errar uma palavra é diferente de errar a compreensão da mensagem.

Nem sempre é necessário ter-se centenas de fontes, como no caso deste projeto de mestrado, que aborda um tema que nasceu há muito poucos anos. Na sua maioria as pesquisas efetuadas remetem-nos para um espaço temporal muito concreto, do ano 2006 até aos dias de hoje, mais concretamente, desde Agosto de 2006. Este tipo de células ainda se encontra num estado embrionário e por isso existem poucas fontes que tratem o assunto.

Para este projeto estávamos muito restringidos ao uso da internet, visto na biblioteca desta universidade não haver um único livro referente a este tipo de células.

É também importante o uso de dicionários, sejam eles bilingues ou monolingues – de referir desde já que todos os dicionários consultados são dicionários online, isto porque são mais atualizados que qualquer dicionário em versão papel. Entre eles também foi necessário recorrer a dicionários específicos da área. Os dicionários bilingues são bastante úteis porque nos dão várias alternativas para uma palavra e ajudam-nos a saber quais as palavras que se encontram disponíveis para se utilizar e permitem-nos lembrar uma palavra esquecida. Já os dicionários monolingues são essenciais na vida de um tradutor, pois estes ajudam-nos a decidir qual a melhor palavra a ser empregue no texto, isto porque nos ajudam a perceber se a palavra utilizada é a mais correta tendo em conta contexto. É necessário possuir um bom dicionário monolingue, de forma a poder encontrar os vários sentidos de uma palavra e, assim, conseguir escolher o mais adequado para a tradução em questão. Como exemplo de dicionários podemos nomear o *Priberam*, um dicionário da língua portuguesa, que se encontra online e que em algumas

situações nos dá a tradução; *Dicionário de Termos Médicos da Porto Editora*, que nos permite ter acesso a um vasto número de termos médicos. Este foi muito útil na tradução do nome de algumas doenças que aparecem mencionadas no texto de partida; e no caso dos dicionários em inglês usou-se o *Dictionary.com*, um dicionário monolíngue na língua inglesa, e o *Webster's Online Dictionary*, um dicionário bastante completo pois permite-nos ver a palavra num certo contexto e também nos disponibiliza uma área bilingue.

Também se recorreu a enciclopédias como a *infopédia*, que como descrito na sua página de introdução é “[...] a maior ENCICLOPÉDIA multimédia online e inclui um amplo conjunto de matérias de cariz enciclopédico, linguístico e gráfico, abrangendo todas as áreas do conhecimento.” (http://www.infopedia.pt/que_intro.jsp#Que). Temos também de referir o Manual Merck, uma Biblioteca Médica online, que foi de muita ajuda na comparação de doenças quando a tradução da mesma se revelava confusa. Esta confusão era frequente em doenças que tanto poderiam ser referidas pelo nome da pessoa que a estudou, constituindo assim um epónimo, como pelo nome científico.

A terminologia é fundamental na vida de um tradutor. Sem ela os textos teriam imensas incoerências que poderiam tornar o texto traduzido num texto sem sentido. É fundamental que um termo, quer apareça duas ou dez vezes, seja sempre traduzido da mesma maneira, de forma a evitar confusões. Nas palavras de Gouadec:

In fact, if the terminology is not available the translation will not be adequate. Besides, terminology is a highly sensitive substance since it is the sign of knowledge ability and technical competence and even the slightest error may have quite impressive consequences. (Gouadec, 2007: 22)

Dentro das bases de dados, a que mais se utilizou foi o IATE. Esta é uma base de dados criada pela União Europeia e, como tal, de grande credibilidade para qualquer tradutor. Os termos contidos nesta base de dados vêm com as respetivas fontes e data nas quais essas fontes foram consultadas. Tem também um medidor de fiabilidade, que vai de uma estrela a cinco estrelas. Nesta base de dados podemos fazer pesquisa de uma língua para várias línguas e podemos fazer uma

pesquisa por um domínio específico. No entanto, esta base, embora de grande valor, nem sempre disponibiliza uma opção para o que se procura.

Os motores de busca utilizados foram só dois e ambos pertencentes à mesma empresa, a *Google*, e neste caso foram o *Google* em português e em inglês, tendo sido preterido o domínio *.com*. Ao fazer-se pesquisa diretamente no *www.google.co.uk* foi possível efetuar-se uma maior seleção da qualidade do inglês escrito, pois permite-nos pesquisas somente para páginas escritas no Reino Unido e ao usar-se o *www.google.pt* podemos restringir todos os textos escritos em português europeu, evitando assim todos os textos não escritos nessa mesma variante do português.

Foi também usado o *Google books*, na sua maioria em inglês e em português do Brasil. Estes foram úteis para se encontrar textos de genética não disponíveis em Portugal. De referir, no entanto, que nenhum desses livros se encontrava disponível para visualização completa. No caso dos livros em inglês, estes serviram como textos paralelos na língua de partida e no caso dos livros em português do Brasil, uma vez que não existem livros nesta matéria escritos em português europeu, serviram para encontrar termos que com uma ou outra variação são semelhantes ao português europeu. Contudo, os termos da variante do Brasil nunca foram perspectivados como a escolha final para a tradução.

Uma outra fonte de informação foram todos os sítios da internet que foram consultados aquando da construção da base de dados presente neste projeto. Para a construção da mesma recorreu-se a muitos glossários existentes. Esses glossários apresentaram alguma dificuldade uma vez que estavam incompletos ou desatualizados. Neste caso houve necessidade de se cruzar dados entre os mesmos e a escolha recaiu quase sempre sobre aquele cuja data de atualização era mais recente. Também se teve a necessidade de confirmar a fiabilidade desses glossários. Para tal procurou-se informações dentro do próprio sítio de internet e noutra tipo de instituições. Neste tipo de instituições encontram-se universidades com departamento de investigação neste tipo de células e instituições privadas, sendo que algumas dessas instituições trabalham em colaboração com universidades.

Recorreu-se também a resumos existentes em artigos escritos por investigadores portugueses, isto porque os artigos são sempre em inglês, língua

onde se encontra bastante material, contendo somente o resumo escrito em português. Estes foram de bastante utilidade na procura da tradução de termos mais complexos. Entre estes sítios, onde se encontrou artigos, podemos referir o Instituto Nacional de Saúde Ricardo Jorge e o *National Center for Biotechnology Information (NCBI)*, este último é um centro muito conhecido e para onde muitos investigadores estrangeiros enviam trabalhos.

Os jornais generalistas, como O Público, também foram de grande utilidade, não devido à informação veiculada, isto porque na peça consultada o que interessava não era a investigação mas sim o facto de haver investigadores portugueses a desenvolver trabalhos na área da genética, no entanto, como em qualquer peça jornalística, há sempre uma outra referência ao trabalho desenvolvido e na mesma aparece um ou dois termos importantes para o trabalho do tradutor.

6.3 A revisão do documento

Como não existem traduções perfeitas logo ao início é muito importante fazer a revisão do texto.

A revisão foi efetuada no fim da tradução e visou acima de tudo detetar erros ortográficos, coerência, em especial nos termos constantes da base dados, frases mal traduzidas devido a qualquer má compreensão do texto e estilo.

A tradução consistiu da leitura do texto de chegada, recorrendo algumas vezes ao texto de partida.

Em certas situações recorreu-se à ajuda de um estudante do curso de Biotecnologia, que apoiou acima de tudo na indicação de bibliografia que pudesse ser consultada.

7. Problemas de tradução

Neste capítulo iremos abordar os problemas que encontramos durante a tradução desta obra. Desde já temos de referir que todos estes problemas foram resolvidos recorrendo aos mais variados tipos de recursos dos quais dispusemos. Entre estes temos de incluir os dicionários, bilingues e monolingues, a literatura existente sobre a matéria e vários sítios de internet, assim como documentos, especializados ou não na matéria. Em relação aos especializados podemos dar como por exemplo, sítios de internet de universidades que estudam este tema, páginas de institutos que trabalham exclusivamente com a área da genética, jornais e documentos especializados; em relação aos não especializados podemos nomear artigos de jornais generalistas e documentos que, não sendo da especialidade, também desenvolvem trabalhos que podem ser vistos como paralelos, como por exemplo sítios da internet sobre doenças cuja cura poderá provir dos trabalhos com este tipo de células. Estes documentos e sítios de internet nem sempre foram de grande ajuda à pesquisa de equivalentes em língua portuguesa, no entanto, serviram como ponto de partida para outras pesquisas. Também de referir que só foram pesquisados documentos escritos em inglês e português europeu.

Antes da tradução, e como referido acima, foi necessário elaborar a base de dados. Foi na elaboração desta base que ocorreram o maior número de problemas. Isto aconteceu porque a grande maioria dos termos constante nesta base era relativamente novo e, para tal, a procura de uma tradução para o mesmo revelou-se bastante difícil, sendo que em alguns casos não foi possível fazer uma tradução do mesmo, optando-se por manter o termo na língua de partida.

Estes são alguns exemplos de dificuldades encontradas durante a tradução:

AND e ARN

“Although the protocol is technically very complex, since the technology is RNA based, it completely eliminates the risk of genomic integration and insertional mutagenesis inherent to all DNA-based methodologies.”

Não se pode afirmar que estes termos tenham revelado uma dificuldade muito grande, mas aquando da tradução houve necessidade de chegar a uma solução. Traduzir ou não traduzir. Este é um dos casos em que a escolha depende do tradutor pois ambos os termos são aceites na língua portuguesa. Para DNA a tradução é ADN e para RNA é ARN. Neste caso optou-se por se traduzir ambas as siglas pois chegou-se à conclusão que as mesmas não apresentam problemas de maior, visto serem ambas conhecidas e facilmente identificáveis pelo leitor. De dizer também que após várias pesquisas se chegou à conclusão que ambos os termos são usados de igual modo em português e inglês.

miRNA e RNAm

“miARNs are 22 nt non-coding small RNAs that regulate expression of downstream targets by messenger RNA (mRNA) destabilization and translational inhibition (Subramanyam and Blelloch 2011).”

Se anteriormente foi fácil optar pela tradução para o português, neste caso, o termo RNA vem antecedido do *mi* de *micro* e depois vem precedido do *m* de *messenger*. Em casos semelhantes encontra-se a tradução para o termo, no entanto, nem sempre existe uma tradução da sigla para o português, mas após uma pesquisa encontrou-se no sítio de internet da netfarma (portal dos profissionais do sector farmacêutico) um texto onde vinham traduzidos ambos os termos:

“Aquele dispositivo tecnológico permite identificar e regular alvos específicos de micro-ARN (miARN) e ARN mensageiro (ARNm), com o objectivo de afectar a expressão genética mediada por ARNs, noticia o “Pharmaceutical Online”.
(http://industria.netfarma.pt/index.php?option=com_content&task=view&id=984&Itemid=2). Neste caso, e como o Portal da netfarma é bastante credível, optou-se pelo uso das expressões em português.

Plural das siglas e acrónimos

Este é um verdadeiro problema, pois são raros os casos em que as siglas aparecem no plural. Este problema foi resolvido após uma consulta na internet, em especial nos sítios da língua portuguesa, como FLiP, da Porto Editora, onde vem explicado desta forma o uso das marcas de flexão:

“No caso das siglas, acrónimos e abreviaturas, é muito usual o uso das marcas de flexão em alguns casos, nomeadamente com adjunção de -s no final (ex.: *PMEs*). Tal uso, não sendo proscrito pelas regras de ortografia portuguesa (o acordo ortográfico em vigor é omissivo nesse aspeto), carece de motivo lógico, como acima foi defendido e obrigaria, por exemplo, no caso de se considerar que se trata de uma aplicação das regras gerais de flexão, a adaptações ortográficas no caso de siglas ou acrónimos terminados em consoantes (ex.: *PALOPes*).”

(<http://www.flip.pt/Duvidas-Linguisticas/Duvida-Linguistica.aspx?DID=1570>).

Isto pode ser confirmado no excerto referido em cima, no tópico “miRNA e RNAm”, que se replica aqui:

“Aquele dispositivo tecnológico permite identificar e regular alvos específicos de micro-ARN (miARN) e ARN mensageiro (ARNm), com o objectivo de afectar a expressão genética mediada por ARNs, noticia o “Pharmaceutical Online”.

(http://industria.netfarma.pt/index.php?option=com_content&task=view&id=984&Itemid=2).

Neste caso, e sempre que necessário, recorreu-se ao uso do plural nas siglas e acrónimos existente no texto.

Siglas e Acrónimos: tradução ou não tradução

Neste tipo de obras é muito natural a existência de siglas e acrónimos ao longo do texto. Se na língua de partida, que é ao mesmo tempo a língua utilizada na linguagem científica, existe todo o tipo de siglas e acrónimos, na língua portuguesa o mesmo nem sempre sucede. Isto acontece porque quem trabalha neste campo está bastante acostumado a trabalhar com o inglês, optando-se pela tradução dos termos mas não das siglas e acrónimos. Nesta situação houve, no entanto, necessidade de se procurar todas e quaisquer siglas/acrónimos adaptados ou traduzidos para o português. Houve bastantes que não tinham tradução, sendo que só havia equivalente para os termos mais utilizados na língua portuguesa. Nestes podemos encontrar as siglas/acrónimos de doenças como a ELA, esclerose lateral amiotrófica, e a DMD/BMD, Distrofia Muscular de Duchenne/Becker. Como exemplo de casos onde não existe tradução da sigla/acrónimo podemos encontrar as *EpiSC*, *Epiblast Stem Cells*, e *mESCs*, *mouse embryonic stem cells*.

In addition e reported

Nesta obra existem certas expressões que ocorrem naturalmente no inglês e que, embora também existam no português, a verdade é que a tradução literal das mesmas revela um português pouco cuidado e muito repetitivo. Para se evitar isso houve necessidade de algumas adaptações, embora sempre com o cuidado de nunca se alterar o significado ou compreensão do texto, pois uma tradução deve recorrer aos mais variados recursos linguísticos sem nunca comprometer a mensagem a ser passada. Entre estas expressões podemos encontrar, como exemplo, *In addition e reported*. Se a tradução literal do primeiro é *em adição* e a do segundo *reportaram*, na realidade, em português, estas são expressões que podem ser preferencialmente traduzidas como *para além disso, adicionalmente, referiram, mencionaram*. Ao optar-se por estas traduções conseguimos um texto mais fluído e cuidado, evitando as repetições.

Outro dos problemas encontrados foi a tradução do subtítulo do ponto 4.1.3 da obra. No original encontramos o seguinte subtítulo *Late events toward pluripotency*. Neste caso a primeira tradução a ser considerada foi *Eventos tardios para a pluripotência* mas o mesmo gerou alguma confusão na compreensão pois a mensagem que se quer passar é *em direção a, no sentido da* e como tal optou-se por traduzir por *Eventos tardios em direção à pluripotência*.

Close cell-cell contacts

Esta expressão apresentou um problema e uma dúvida. A dúvida residia no hífen existente em *cell-cell*, sendo que à primeira vista se interpretou isto como *célula a célula*, mas após uma pesquisa revelou-se que a interpretação não poderia ser esta. As pesquisas revelaram que a expressão *célula-célula* com manutenção do hífen existe em textos portugueses. Eis um dos exemplos referidos:

“*In vitro*: proliferação de células e não *in vivo*; redução de interações célula-célula e célula-matriz; “

(Veja-se o pdf *BIOTECNOLOGIA DE CÉLULAS ANIMAIS*, do Prof. Doutor. José António Belo, 2006. Disponível em <http://w3.ualg.pt/~jbelo/documentos/BCA/Teoricas%20BCA2006-07.pdf>)

Tendo-se resolvido esta dúvida surgiu o problema que adveio do uso incorreto das palavras a utilizar e desconhecimento da área abordada aquando da tradução. Inicialmente foi traduzido como *contactos célula-célula próximos*, mas aqui havia algo que não parecia bem, pelo que se releu a frase do texto de partida e saltou à vista a expressão “(...)are epitelial in nature,(...)”. Após isto foi-se pesquisar a expressão “epitélio” e chegou-se à conclusão de que, segundo a Infopédia: “O tecido epitelial é constituído por células justapostas, sem espaços entre si, que se dispõem em folhetos que revestem superfícies ou que se agregam em massas celulares, formando glândulas.” ([http://www.infopedia.pt/\\$tecido-epitelial](http://www.infopedia.pt/$tecido-epitelial)), o que fez com que se alterasse para *contactos célula-célula*, uma vez que o facto de serem epiteliais já revela proximidade, resolvendo-se prescindir do *próximos*. Terminado isto, voltou-se a olhar para as pesquisas na internet e em nenhum caso apareceu *contactos célula-célula*, mas sim *interações célula-célula*. No final a frase que se utilizou foi *interações célula-célula*.

Distúrbios ou Desordens

Este é um problema com o qual muitos tradutores se debatem, traduzir *disorder*. Tanto um termo como o outro são usados na linguagem da medicina mas pelas pesquisas efetuadas foi possível reparar num padrão. O termo *disorder* aparece em duas situações distintas, na primeira remete-nos para a neurologia e na segunda remete-nos para o sangue. Se no caso das doenças neurológicas o termo mais utilizado é *distúrbios*, com 13.900 entradas no Google Portugal, no caso das doenças relacionadas com o sangue apareceu-nos somente sete entradas no Google Portugal, mas neste caso duas dessas entradas eram panfletos informativos do Infarmed. Em relação às buscas no Google pode haver alguns problemas de credibilidade, mas qualquer documento do Infarmed, Instituto Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde I.P, é por si só sinal de credibilidade.

No primeiro caso temos como exemplo um artigo, de uma publicação *online* denominada Ciência Hoje, cujo título é “Distúrbios neurológicos afetam 164 milhões de europeus” (<http://www.cienciahoje.pt/index.php?oid=50785&op=all#>). Para o segundo caso, *desordem*, temos um excerto de uma bula de um medicamento, neste caso o Ozonol, onde na parte dos efeitos secundários vem descrito: “Sangue e

Sistema Linfático: desordens hematopoiéticas (anemia, leucopénia, trombocitopénia, pancitopénia, agranulocitose) (muito raro).” (Infarmed, http://www.infarmed.pt/infomed/download_ficheiro.php?med_id=6573&tipo_doc=fi).

Por isso, a palavra *disorder* foi traduzida como “desordem” nos casos em que o texto referia ao termo “hematopoiético” e como “distúrbio” nos casos em que o texto se referia a doenças.

A tradução é por vezes vista como a mera transposição de uma língua para outra, mas na realidade é muito mais do que isso. Não é só ler um texto e escrevê-lo outra vez numa língua diferente. É necessário ter-se competências para o fazer. É necessário ter-se algum conhecimento na área em que se traduz, é necessário terem-se conhecimentos da língua e da cultura à qual a tradução se destina e, também muito importante, é ter-se um grande conhecimento do público-alvo e da maneira como esse público se expressa e compreende um determinado texto.

Não se traduz afinal de uma língua para outra, e sim de uma cultura para outra; a tradução requer assim, do tradutor qualificado, um repositório de conhecimentos gerais, de cultura geral, que cada profissional irá aos poucos ampliando e aperfeiçoando de acordo com os interesses do setor a que se destine o seu trabalho. (CAMPOS, 1986: 27s).

Ao tradutor é sempre exigido um bom trabalho independentemente do texto que traduz, mas o tradutor, como qualquer outra pessoa, não detém o conhecimento todo. Para compensar estas falhas no conhecimento é necessário recorrer às mais variadas pesquisas e, sem nunca esquecer que para todo o conhecimento existe uma fonte e a mesma tem de ser credível.

Tendo isto em mente, o tradutor decidiu elaborar uma base de dados onde constassem todos os termos mais complexos que apareceram durante o trabalho, alguns do conhecimento do tradutor, no entanto, a grande maioria eram desconhecidos. O desenvolvimento da base de dados revelou-se bastante trabalhoso, contudo, o atraso que se sofreu na realização da mesma levou depois a que a tradução fosse mais rápida e eficiente, e também se pôde colocar em prática todos os conhecimentos adquiridos no que concerne à pesquisa em linha. Espera-

se também que esta base sirva mais tarde a algum tradutor que precise e, quem sabe, venha a ser ampliada.

As CAT (Computer Aided Translation Tools) são ferramentas muito úteis no trabalho de qualquer tradutor mas nem todos os tradutores recorrem a elas, ora devido ao método de trabalho, ao hábito ou mesmo por escolha própria. Para este trabalho optou-se pela tradução sem o recurso a uma ferramenta CAT. Com esta escolha foi possível poupar-se tempo precioso na preparação do texto de partida, uma vez que o mesmo estava em formato papel e teria de ser inteiramente digitalizado.

Este talvez tenha sido o maior erro cometido, numa era digital onde muitos livros já se encontram disponíveis em formato digital, o tradutor, muito por culpa dos hábitos, optou pela compra do mesmo em papel. No futuro, em nome de uma maior celeridade na entrega de futuros trabalhos e facilidade na gestão do trabalho, optar-se-á por aquisição dos documentos em formato digital.

Como em qualquer trabalho este, após uma correção pela orientadora, não estava isento de erros. Estes foram analisado e corrigidos. O processo de correção foi muito útil visto que se tomou atenção ao detalhe e assim pôde-se melhorar a qualidade da tradução.

Este projeto também foi muito importante, pois o tradutor pela primeira vez teve uma verdadeira perceção daquilo que o espera no mundo do trabalho, os prazos que se têm de cumprir, os nervos que se têm durante o mesmo, os problemas que se encontram e como os resolver e, acima de tudo, este trabalho foi muito útil no sentido de o tradutor ter definitivamente encontrado algo que adora traduzir, o texto científico.

8. Base de dados terminológica

Neste capítulo iremos em primeiro lugar começar por falar da terminologia, do porquê de se ter elaborado uma base de dados terminológica e de qual a sua utilidade para este trabalho. Em seguida iremos descrever o processo de construção dessa mesma base de dados terminológica e os problemas e questões levantadas aquando da sua construção.

De referir que, devido à sua extensão, a base de dados terminológica será entregue em versão CD e encontrar-se-á anexada ao relatório. Desta forma, com um simples gesto, é possível pesquisar o termo graças à opção de procura do programa Excel, aceder aos sítios presentes com um só clique e, ainda, visualizar na totalidade, ou de forma mais pormenorizada, os termos presentes na base de dados terminológica.

8.1 Terminologia

O quê é a terminologia? Cabré ressalta três diferentes conceções sobre os termos. Para a linguística, os termos são o conjunto de signos linguísticos que constituem um subconjunto dentro do componente léxico da gramática de determinada pessoa. Os termos, para a linguística, são uma forma de saber. Para a filosofia, a terminologia é um conjunto de unidades cognitivas que representam o conhecimento especializado. É, portanto, uma forma de conhecer. E, por fim, para as diferentes disciplinas técnico-científicas, a terminologia é o conjunto das unidades de expressão e comunicação que permitem transferir o pensamento especializado. Portanto, é uma forma de transferir, de comunicar .

No caso deste trabalho achou-se por bem inserir as definições dos termos. Estas foram inseridas para que o público-alvo menos familiarizado com alguns termos, em especial os mais recentes, soubesse do que se tratava sem ter de perder muito tempo em pesquisas que poderiam desviar a sua atenção do que realmente é importante, a leitura da obra.

Devido ao caráter deste projeto, a tradução de um livro científico, a base de dados terminológica foi essencial dado o elevado número de termos genéticos existentes no texto. Poupan-se assim bastante tempo ao ter-se entendido o contexto em que eram utilizados e encontrado a tradução desses termos logo no início do trabalho. O que permitiu que a tradução desses termos fosse coerente do princípio ao fim, como um trabalho deste género obriga.

Para este trabalho optou-se por uma base de dados terminológica bilingue na língua de partida e de chegada. Dela consta o termo, a definição do mesmo e a fonte da respetiva definição, a sigla e um sinónimo (quando os mesmos existem). Isto tudo nas respetivas línguas com que se trabalhou. No diagrama em baixo pode-se ver como está organizado o glossário.



8.2 Elaboração da base de dados terminológica

Começou-se por preencher a parte da língua de partida e depois a da língua de chegada. Ao trabalhar-se neste sentido foi possível chegar mais rapidamente ao termo de chegada, uma vez que já se encontrava disponível uma definição do termo.

A parte mais complicada foi encontrar as siglas ou acrónimos para o termo em português. Isto acontece porque, muitas vezes, nos textos científicos escritos em português, se opta por traduzir o termo e em muitos casos não se proceder da mesma maneira em relação à sigla ou acrónimo. Um motivo para que isso aconteça é porque são poucos os textos científicos escritos em português e, como tal, os autores estão mais familiarizados com a sigla em inglês, fazendo quase sempre a tradução do termo somente para que as pessoas pouco familiarizadas com o mesmo saibam o que é, e como a sigla ou acrónimo são somente uma forma

abreviada do todo, opta-se por não se traduzir visto que a respetiva explicação do termo já se encontra disponível.

Optou-se também por não incluir todos os termos técnicos existentes na obra nesta base de dados terminológica porque muitos deles são nomes de compostos usados nas experiências e cuja nomenclatura é aceite internacionalmente, e por isso não existe uma tradução para os mesmos. Neste caso os mesmos foram deixados de fora. A base de dados terminológica foi elaborada num ficheiro *Excel*. Foi usado este formato de ficheiro devido à facilidade com que se pode organizar e consultar os termos lá inseridos.

9. Reflexão crítica

O quê é a tradução? O que é um tradutor? Estas são questões importantes para quem quer ingressar nesta profissão. Traduzir é transpor um texto, o de partida para o de chegada, mas aqui entram vários fatores. É necessário o tradutor ter bons conhecimentos gerais, compreender o texto, a cultura, a tipologia do texto e acima de tudo, ter conhecimentos da língua, em especial a língua para que se traduz, e é também necessário ter um bom conhecimento do público alvo do texto. Neste contexto, Geir Campos define assim a tradução, no seu livro *O que é Tradução*:

Não se traduz afinal de uma língua para outra, e sim de uma cultura para outra; a tradução requer assim, do tradutor qualificado, um repositório de conhecimentos gerais, de cultura geral, que cada profissional irá aos poucos ampliando e aperfeiçoando de acordo com os interesses do setor a que se destine o seu trabalho. (CAMPOS, 1986: 27s.).

Para se traduzir é necessário ter muitas competências, não basta pegar num texto e traduzi-lo para outra língua. Existe por parte do tradutor um enorme trabalho de pesquisa e de análise que não pode ser desprezado. Este projeto envolveu inúmeras pesquisas e um trabalho de análise cuidadoso, o que contribuiu para que este trabalho se revelasse extremamente enriquecedor para o tradutor.

A realização de uma base de dados terminológica foi um dos pontos importantes deste projeto, pois adquiriu-se experiência na pesquisa em linha, foram descobertos novos sítios de pesquisa, que se creem vir a ser muito úteis no futuro. A pesquisa elaborada acarretou algumas dificuldades e por isso demorou bastante tempo, pois era fundamental que todos os resultados obtidos nessa pesquisa fossem de fontes fidedignas. De dizer também que esta Base de Dados foi bastante útil para a realização da tradução, e crê-se que a mesma poderá vir ser útil no futuro, em caso de uma tradução de teor semelhante à tradução desenvolvida para este projeto e para colegas tradutores que queiram desenvolver os seus trabalhos na área das ciências genéticas.

A experiência que sai deste trabalho é muito positiva, pois foi a primeira vez que o tradutor traduziu um texto tão extenso. Esta tradução serviu para que o tradutor tivesse uma maior familiarização com a vertente mais prática da tradução. Aqui existia, logo à partida, uma data para a entrega deste projeto, levando o tradutor a ter de ajustar muito bem todo o seu trabalho ao tempo disponível. Exigiu também que o trabalho final revelasse grande qualidade, pois o mesmo seria avaliado no final do projeto, à semelhança daquilo que acontecerá no futuro enquanto tradutor, porque a tradução é sempre alvo de uma avaliação.

De referir que a tradução, ao contrário de outras áreas onde existe uma especialização em algo, é uma tarefa que obriga o tradutor a ter conhecimentos alargados, sendo, muitas vezes, pedido ao tradutor que traduza textos com os quais está pouco familiarizado. Neste ponto, e uma vez que o tradutor não é especializado na área, este projeto serviu para que o mesmo se informasse mais sobre uma área muito específica da ciência. Com este trabalho o tradutor obteve não só mais conhecimentos sobre a genética, como também encontrou algo com o qual gostaria de trabalhar no futuro, e não só foi possível aprofundar este tema, como foi possível adquirir-se alguns conhecimentos sobre o texto científico.

Tendo isto em conta, este trabalho revelou-se um desafio muito interessante pois possibilitou o desenvolvimento das capacidades do tradutor e a aquisição de conhecimentos linguísticos e culturais que o prepararam para um futuro nesta área.

Conclusão

Para este trabalho foram despendidos largos meses de trabalho, sendo os mesmos despendidos entre a Universidade de Aveiro e local de habitação do tradutor. Foi na Biblioteca da Universidade de Aveiro que foram desenvolvidas a grande maioria das pesquisas que foram necessárias para a realização deste trabalho. Neste tipo de pesquisas temos obrigatoriamente de mencionar a elaboração da base de dados, que pelos motivos referidos acima, foi a parte mais difícil deste trabalho.

Este trabalho também foi muito bom para o tradutor, pois o contexto do texto não só se insere no âmbito deste mestrado, como também é uma área, embora não completamente nova ao tradutor, pela qual o mesmo se interessa e que no espaço de um ano, desde o trabalho feito para a cadeira de projeto, do primeiro ano de mestrado, esta área sofreu um desenvolvimento enorme. Portanto, todo o trabalho desenvolvido na unidade curricular acima mencionada foi de uma grande utilidade, mas ao mesmo tempo de pouca, pois parecia que de um ano para o outro o tema tinha dado uma 'volta' de 180°.

Todos os dias era uma nova batalha, não só devido aos prazos de entrega deste trabalho, mas também à necessidade que havia por parte do tradutor em completar o mesmo a tempo e com qualidade. Todos os dias havia um novo objetivo a ser cumprido e, muitas vezes, uma nova dificuldade a ser ultrapassada. É crença do tradutor que todas as dificuldades foram ultrapassadas embora a dificuldade sentida no início visto o mesmo não ser formado na área em questão.

Nesta conclusão não nos podemos esquecer daqueles que realmente interessam neste trabalho, o público-alvo. Com este trabalho o tradutor conta contribuir para uma maior e melhor compreensão do tema por parte do público e quem sabe no futuro vir a servir de ajuda mesmo àqueles a quem, à priori o texto não diz muito. Nesta parte temos de incluir a base de dados que poderá ser muito útil a esse público não especializado, em especial a tradutores que no futuro se

interessem pelo trabalho nesta área. Crê-se que está bastante completa pois na mesma foram incluídos muitos termos até então pouco divulgados.

Para finalizar, todos os conhecimentos adquiridos com este trabalho foram muito enriquecedores, permitiu ao tradutor trabalhar numa área de interesse e, de certo modo, especializar-se na mesma, como também foi muito bom como mostra daquilo que poderá ser o futuro do tradutor.

Referências

Referências bibliográficas:

Corpus:

YILDIRIM, Sibel (2012). *“Induced Pluripotent Stem Cells”*. New York: Springer.

Textos consultados:

BASSNETT, Susan (2011). *Reflections on translation*. Bristol: Multilingual Matters.

BAKER, Mona (2001). *Encyclopedia of translation studies*. New York: Routledge

CABRÉ, M. Teresa (1993). *La terminología: Teoría, metodología, aplicaciones*.
Barcelona: Editorial Antártida/ Empuries.

CABRÉ, Maria Teresa. La terminología hoy: concepciones, tendencias y aplicaciones. *Ciência da Informação*. v. 24, n. 3, 1995.

CAMPOS, G (1986). *O que é tradução*. São Paulo: Brasiliense.

GARCÍA YEBRA, Valentín (1994). *“Traducción: Historia y teoría”*. Madrid: Gredos.

GOUADEC, Daniel (2007). *Translation as a profession*. Amsterdam: John Benjamins Publishing Company.

FURLAN, Mauri (2005). *Brevíssima história da teoria da tradução no Ocidente: III: Final da Idade Média e o Renascimento*. Florianópolis: PGET

SAMUELSSON-BROWN, Geoffrey (2004). *A practical Guide for translators*.
Clevedon, Buffalo & Toronto: Multilingual Matters.

TROSBORG, Anna (1997). *Text Typology and Translation*. Amsterdam: John Benjamins Publishing Company.

Referências em linha:

“II Congresso de análises clínicas e saúde pública da sociedade portuguesa de bioanálises da saúde” (2004). Disponível em: <http://www.spbs.pt/bioanalise/2004/bioanalise-jan-04.PDF>

ALFARO, Caroline, DIAS, Maria Carmelita. “Sistemas de tradução por máquina: ferramentas de auxílio à tradução”. Disponível em: <http://www.tecgraf.puc-rio.br/~carolina/ferramentas.html>

ALVES, Fernando Ferreira (2006). “*Quase tudo o que eu (sempre) quis saber sobre tradução*”. Disponível em: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/handle/1822/5890>

ANDRADE, Mariana (2007). “Avaliação de efeitos citotóxicos, morfológicos e ultrastruturais de microcistinas em células Vero”. Disponível em: http://www.fc.up.pt/fcup/contactos/teses/t_050370154.pdf

“Aplicações terapêuticas com células estaminais”. Disponível em: [http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CCkQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.bebevida.pt%2Fficheiros_artigos%2FAplica%25C3%25A7%25C3%25B5es%2520Terap%25C3%25AAuticas\(1\).pdf&ei=1n6IUOXvCcaRhQef04DYAw&usq=AFQjCNEwWzqpZjx57tiT8xEVcPFWs8V7og&sig2=wf87M3rykc_cOCiCwwKXPw&cad=rja](http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CCkQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.bebevida.pt%2Fficheiros_artigos%2FAplica%25C3%25A7%25C3%25B5es%2520Terap%25C3%25AAuticas(1).pdf&ei=1n6IUOXvCcaRhQef04DYAw&usq=AFQjCNEwWzqpZjx57tiT8xEVcPFWs8V7og&sig2=wf87M3rykc_cOCiCwwKXPw&cad=rja)

CARDOSO, Hugo Branco (2010). “Marcadores epigenéticos em células HC11 diferenciadas e não diferenciadas”. Disponível em: <http://ria.ua.pt/bitstream/10773/3144/1/2010001299.pdf>

“Cell Biology 101” (2010). Disponível em: http://www3.bio-rad.com/cmc_upload/Products/-48857/Bulletin_5971A.pdf

DA COSTA, Ana Maria (2008). “Asma de longa evolução: condicionalismos do envelhecimento”. Disponível em:

<https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/8539/3/Tese%20AMPTBFC%20-%20Sum%C3%A1rio%20e%20Introdu%C3%A7%C3%A3o.pdf>

DA SILVA, Sónia (2007). “Estudos funcionais para determinação da patogenicidade de novas mutações no gene LDLR – Diagnóstico e caracterização molecular da hipercolesterolemia familiar”. Disponível em:

http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/1385/1/20305_ulfc080499_tm.pdf

DE ALMEIDA, Luís Pereira (2012). “Uma nova alquimia: de células da pele, em células estaminais e neurónios”. Disponível em: http://www.cnbc.pt/pdf/cronica_3.pdf

DE MATOS, Clara (2008). “Novos híbridos triticales X tritordeum: obtenção e estudo da actividade nucleolar”. Disponível em:

http://repositorio.utad.pt/bitstream/10348/164/1/msc_csmmatos.pdf

DIAS, Eva Cristina (2006). “Hormona de crescimento GH e a regulação da sua expressão pelo factor de transcrição Pit-1”. Disponível em:

http://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBsQFjAA&url=http%3A%2F%2Fciencias.iscsn.cespu.pt%2Fservicos-online%2Fdocumentos%2Fdoc_download%2F55-monografia-doencas-associadas-a-mutacoes-na-pit1.html&ei=tnulUP76JYXKhAf5voHABQ&usg=AFQjCNHu-ORei1yD9KwmaDZaQ2I-NF5zg&sig2=O4IENEzFvXejPQBRBaAo7Q&cad=rja

“Doenças em que podem ser utilizadas células estaminais do sangue do cordão umbilical”. Disponível em: http://www.crioestaminal.pt/pt/pdfs/aplicacoes_atuais.pdf

DOS SANTOS, Patrícia (2009). “Avaliação da incidência da Gamapatias Monoclonais nos doentes da área do Centro Hospitalar Tâmega e Sousa, EPE”.

Disponível em: [http://repositorio-](http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/22600/2/Patricia%20SantosDissertao.pdf)

[aberto.up.pt/bitstream/10216/22600/2/Patricia%20SantosDissertao.pdf](http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/22600/2/Patricia%20SantosDissertao.pdf)

FERREIRA, Teresa (2010). “Criação e exploração de um corpus bilingue (IN-PT) sobre células estaminais”. Disponível em: http://run.unl.pt/bitstream/10362/4660/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o_TeresaFerreira.pdf

FILIPE, Ana Cristina (2008). “Terapia génica para doenças vasculares: desenvolvimento de novos vectores para a entrega intracelular de genes de factores angiogénicos”. Disponível em: <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/6002/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o.pdf>

FONSECA, Lídia (2012). “Lentiviral target-specific strategy for molecular therapy”. Disponível em: http://repositorio.ul.pt/bitstream/10451/5765/1/ulsd062223_td_Lidia_Fonseca.pdf

FONTES, Rui. “Metabolismo do Glicogénio”. Disponível em: http://users.med.up.pt/ruifonte/PDFs/PDFs_arquivados_anos_anteriores/2010-2011/G2010-2011/G08_MetGlicogenio.pdf

GIRÃO, C. (2005). “Polimorfismo – 160 C/A no promotor do gene da E-caderina e risco de cancro da próstata numa população portuguesa”. Disponível em: <http://www.apurologia.pt/acta/1-2005/poli-160ca.pdf>

GOLDTHWAITE, Charles. “The promise of induced pluripotent stem cell (iPSCs). Disponível em: http://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/2006chapter10.htm

GROSS, Alex (1996). “The history of translation history”. Disponível em: <http://www.translationdirectory.com/article343.htm>

“Hipercolesterolemia familiar. Se tem colesterol elevado, faça o teste”. Disponível em: <http://www.genetest.pt/pic/conteudo/file/MolduraAF.pdf>

“HLA-ABDR Box 1.0 Typing Kit”. Biocant. Disponível em: <http://www1.biocant.pt/genebox/upload/protocols/0106%20HLA-ABDR%20Box.pdf>

LEAL, Diana (2009). “Síndromes paraneoplásicas cutâneas no cão e no gato: revisão bibliográfica e estudo de casos”. Disponível em: <https://www.repository.utl.pt/bitstream/10400.5/1463/1/S%C3%ADndromes%20Para%20neopl%C3%A1sicas%20Cut%C3%A2neas.pdf>

LIMA, Joana (2011). “Síndromes mielodisplásticas: revisão e eficácia terapêutica hipometilante. Disponível em: <http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/61008/2/SMDtesemestrado.pdf>

“Lista de diagnósticos genéticos” (2012). Disponível em: <http://www.icvs.uminho.pt/scientificservices/moleculardiagnosics/Lists/Forms/Attachments/25/LISTA%20EXAMES.pdf>

“Lista de substâncias e métodos proibidos” (2011). Disponível em: http://www.dn.pt/DNMultimedia/DOCS+PDFS/DESPORTO/ANTIDOPING/2011_lista_proibida.pdf

LOURENÇO, Miguel (2005). “Leiomiossarcoma do escroto. Caso clínico e revisão da literatura”. Disponível em http://repositorio.hff.min-saude.pt/bitstream/10400.10/155/1/Acta%20Urol_11.pdf

MOEN, Pirjo (2010). “Scientific writing”. Disponível em: <http://www.cs.helsinki.fi/u/ronkaine/msc-studies/Scientific-writing-1.20092010.pdf>

MOTTA, Valter T. “Bioquímica Clínica: Princípios e interpretações. Volume 8”. Disponível em: <http://www.labclinisul.com.br/artigos/Bioq.Clinica%20-%20Aminoacidos%20e%20Proteinas.pdf>

NEGRIN, Robert, CONTAG, Christopher (2006). “In vivo imaging using bioluminescence: a tool for probing graft-versus-host disease”. Disponível em: <http://www.bumc.bu.edu/stemcells/files/2009/09/Negrin-Nat-Rev-Immunol-on-GVHD-Transplantation-biology-review-20061.pdf>

OLIVEIRA, Ana Paula. “Prevenção em gastroenterologia”. Disponível em: <http://www.nghd.pt/pdfs/livroNGHD.pdf>

“O que são células estaminais” (2012). A gazeta das Caldas. Disponível em: <http://www.gazetacaldas.com/25432/o-que-sao-celulas-estaminais/>

“Orfadin: Resumo das características do medicamento”. Disponível em: http://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2005/200502218969/anx_8969_pt.pdf

“Patient Care” (2009). Disponível em: <http://www.crioestaminal.pt/pt/pdfs/PatientcareABRIL2009.pdf>

PEREIRA, Eduardo et al (2011). “Ecoendoscopia digestiva na prática clínica parte I – Aspectos técnicos e utilidade na avaliação da parede gastrointestinal”. Disponível em: <http://www.scielo.oces.mctes.pt/pdf/ge/v18n1/v18n1a05.pdf>

“Proteína Activadora-1”. Disponível em: <https://estudogeral.sib.uc.pt/bitstream/10316/540/3/ABREVIATURAS.pdf>

“Retrovírus felinas”. Disponível em: http://www.hospvetmontenegro.com/user/teses/tese_6.pdf

RIBEIRO, Ângela (2010). “Leucemia linfocítica crónica-B – A importância da deleção 17p”. Disponível em: <http://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/52801/2/Leucemia%20Linfocitica%20Crnica%20%20B%20A%20importncia%20da%20deleco%2017p%20%20ngela%20Ribeiro.pdf>

SANTOS, João. “Princípios básicos de imunocitoquímica”. Disponível em: https://www.google.pt/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CBsQFjAA&url=https%3A%2F%2Fwoc.uc.pt%2Fzoologia%2FgetFile.do%3Ftipo%3D2%26id%3D2545&ei=FI2IULTWOOoOphAfX6YGADQ&usq=AFQjCNH0o4pkx6nIMRMUH3QX1rKRn_GXbA&sig2=3OfdHTexB6dC9on4FQITtw&cad=rja

SANTOS, Miriam. “Controlo de qualidade na tradução”. Disponível em: <http://www.periodicos.ufsc.br/index.php/traducao/article/viewFile/6361/5971>

SCHMITT, Fernando (2006). “Regeneração e cicatrização”. Disponível em: http://users.med.up.pt/cc04-10/biopatteoricas/Aula6_RegeneracaoCicatrizacao.pdf

SIMAO, Daniel (2010). “Novas linhas celulares humanas para produção de adenovírus com aplicação em terapia génica”. Disponível em: http://run.unl.pt/bitstream/10362/5264/1/Simao_2010.pdf

“Stem cell facts”. International Society for Stem Cell Research. Disponível em: http://www.isscr.org/public/ISSCR08_PubEdBroch.pdf

TRAVASSOS, Ana et al (2011). “Metanfetamina e o ciclo do glutamato no cérebro de murganho”. Disponível em: http://www.idt.pt/PT/RevistaToxicodependencias/Artigos%20Ficheiros/2011/2/artigo7_Vol17_n2.pdf

“Understanding stem cells: na overview of the science and issues from the national academies”. Disponível em: http://dels-old.nas.edu/dels/rpt_briefs/Understanding_Stem_Cells.pdf

VARGAS, Mónica (2009). “Safer stem celles for therapy”. Disponível em: <http://www.ordembiologos.pt/>

VENUTI, Lawrence (2004). “The translator’s invisibility”. Disponível em: <http://twitdoc.com/upload/ibaiatutxa/the-translator-s-invisibility-a-history-of-translation-lawrence-venuti.pdf>

WATT, Fiona, Eggan, Kevin. “Molecular mechanisms of stem-cell identity and fate”. Disponível em: http://docs.abcam.com/pdf/stemcells/stemcell_poster.pdf

Recursos em linha:

Google Livros

<http://books.google.pt/>

Infarmed

<http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED>

Infopédia

www.infopédia.com

Priberam

<http://www.priberam.pt/>

Motores de busca:

Google

www.google.pt

www.google.en

Anexo

SPRINGER BRIEFS IN STEM CELLS

Sibel Yildirim

Induced Pluripotent Stem Cells

 Springer

SpringerBriefs in Stem Cells

Sibel Yildirim

Células Estaminais
Pluripotentes Induzidas

Prefácio

“O mundo está a mudar” é uma preocupação clássica para pessoas acima dos quarenta. No entanto, a era em que vivemos é um pouco diferente das gerações anteriores. Estamos mais provavelmente entre o clássico e contemporâneo ou entre ficções e factos. A mudança é incrivelmente rápida e a história da biologia ainda está longe de ser completada. Foi somente há umas semanas atrás, 22 de setembro de 2011, que os físicos de partículas, do detetor de partículas ou “Oscillation Project with Emulsion-tRacking Apparatus (OPERA)”, detetaram neutrinos a viajar mais rápido do que a velocidade da luz. Embora seja muito cedo para afirmar que a teoria da relatividade especial de Einstein está errada, os resultados foram descritos como, no mínimo, revolucionários. O mesmo aconteceu em 2006 com a biologia celular. Shinya Yamanaka e a sua equipa descobriram que com as condições existentes as células somáticas completamente diferenciadas podem exercer o seu potencial estado de célula embrionária estaminal. O método para tornar uma célula somática numa célula pluripotente foi relativamente fácil, pelo menos mais fácil do que alguém poderia imaginar até à publicação do trabalho de Yamanaka. A essas células deram o nome de: células estaminais pluripotentes induzidas (CEPi).

A ciência é conhecida por ter estes impulsos repentinos. No entanto, há sempre alguma resistência a mudanças inesperadas. Geralmente demora mais tempo do que o necessário para interpretar as descobertas quando existem resultados que são aplicáveis a muitas situações. Alguns investigadores querem aplicar diretamente e o mais rápido possível os resultados ao mundo real, enquanto que outros, fascinados pelo alcançar de mais um nível de mistério interminável, tendem a desconfiar de que na realidade há algo mais. Contudo, os mais dotados embarcam em explorações das realidades desconhecidas.

A descoberta das CEPi trouxe um pouco de tudo. Neste momento muitos investigadores estão a refinar a técnica para que essas células sirvam para restaurar a saúde humana. Alguns estão a tentar atingir o fundo da gruta da biologia celular, mesmo estando conscientes de que as baterias das suas lanternas estão no limite. No entanto, muito poucos abriram uma era completamente renovada através da biologia matemática.

Este livro tenta explicar os fundamentos por detrás das CEPi e as suas aplicações mas, mais importante ainda, tenta mostrar o porquê de termos de usar a matemática para ir mais além com as CEPi ou outras células ainda por descobrir. As teorias de Stuart Kauffman e Sui Huang apontam os caminhos para resolver muitos problemas na biologia celular e muitas pessoas estão a meditar sobre elas para satisfazer a sua sede intelectual. O Dr. Huang está a mostrar corajosamente o quão impossível é penetrar, pelo senso comum, na torrente de dados provenientes do trabalho de ‘omics’ da biologia. Felizmente, ele está a usar conceitos gerais ou princípios físicos e matemáticos para estabelecer uma sólida base teórica.

Os investigadores da minha equipa começaram a partir da regeneração do dente e inevitavelmente terminaram na biologia da célula estaminal. Pessoalmente, tinha começado por me envolver nos aspetos microbiais das doenças dentárias e agora estou a ser cativada

pela complexidade do sistema biológico, porque é difícil não se ser exposta aos padrões emergentes de todos os sistemas que têm uma ligação em comum: a matemática. Obviamente as CEPi estão a fornecer grandes ferramentas para o estudo de todos os aspetos da biologia, fundamentos através da aplicação. Em conclusão, as CEPi abriram as mentes dos investigadores ao mostrarem que devemos compelir os limites da nossa imaginação para vermos mais.

Estou agradecida ao Sui Huang pela sua generosa e humilde orientação, ao Kursat Turksen por me ter encontrado material suficiente para escrever este livro, à equipa de edição da Springers, em especial à Renata Hutter e à Aleta Kalkstein pela sua preciosa ajuda. Agradeço também ao Kamil Can Akçalı, que me encorajou a seguir os meus instintos. E, por fim, mas não menos importante, agradeço ao Muammer Saglam pelo seu amor incondicional que me levou a sentir a luz.

Índice

1 Introdução

Referências bibliográficas

2 Células Pluripotentes

2.1 Células Pluripotentes Diferenciadas

2.2 Rede Transcricional e Vias de Sinalização da Pluripotência

2.2.1 Rede Transcricional da Pluripotência

Referências bibliográficas

3 Células estaminais pluripotentes induzidas (CEPi)

3.1 Geração da Primeira CEPi

3.2 Reprogramação

3.2.1 Fator de Entrega em Células Alvo

4 Mecanismos Moleculares de Pluripotência.

4.1 Passos na Reprogramação

4.1.1 Aumento na Taxa de Divisão Celular

4.1.2 Mudança Morfológicas

4.1.3 Eventos Tardios no sentido da Pluripotência

4.2 Mecanismos na Reprogramação

4.2.1 Fatores Genéticos

4.2.2 Vias de Sinalização.....

4.3 Dinâmicas da Reprogramação Direta.....

4.4 Modificações Epigenéticas.....

4.5 Semelhanças e Diferenças Entre as CEPi e as CEE.....

Referências bibliográficas.....

5 Modelar Doenças num Prato.....

5.1 CEPi de Específica Doença.....

5.2 Escolher a Fonte das Células.....

5.3 Identificação de Colônias de CEPi.....

5.4 Caracterização da Mutação Genética.....

5.5 Diferenciação das CEPi nos Tipos de Célula Desejados.....

Referências bibliográficas.....

6	Dificuldades para o Potencial Terapêutico das hCEPi.....
6.1	A Reprogramação é Necessária para as Terapias Regenerativas?.....
	Referências bibliográficas.....
7	Nova abordagem para entender a biologia das células estaminais.....
7.1	Saúde Versus Doença.....
7.2	Mudança de Paradigma: Reprogramação como um Processo Raro, mas Robusto.....
7.3	Do Reduccionismo para o Todo.....
7.4	Mais Considerações Futuras.....
	Referências bibliográficas.....
8	Conclusão.....
	Sobre a autora.....
	Índice remissivo.....

Capítulo 1

Introdução

Curiosamente, embora os destinos das células durante o desenvolvimento não sejam restritivos ou irreversíveis, a atitude profundamente enraizada na biologia celular tem sido a de que as células terminalmente diferenciadas perderam o potencial de produzir outras células (Huang, 2009). O primeiro estudo mostrou que os núcleos das células da blástula da rã podiam produzir embriões completos quando transplantadas para embriões fechados (Briggs e King, 1952). Passados alguns anos, Gurdon *et al.* (1958) reprogramou células do intestino totalmente diferenciadas, a partir do *Xenopus* dos oócitos de rãs. Foram precisos 20 anos de incubação para que Evans e Kaufman publicassem, em 1981, o isolamento bem sucedido de células estaminais embrionárias (CEE) (Evans e Kaufman, 1981). Embora a alteração do destino da célula somática tivesse sido alcançada usando oócitos de rã, a transferência nuclear (TN) da célula somática não foi bem sucedida em outros animais até finais de 1990. Por essa altura, Wilmut *et al.* (1997) clonaram a ovelha Dolly. Um ano depois foi reportada a primeira derivação bem sucedida das CEE humanas (Thomson *et al.* 1998). Contudo, as complicações éticas e a escassez de óvulos humanos para fins científicos, a extrema baixa eficiência, os grandes níveis de dificuldades técnicas e a ploidia aberrante levaram a que as investigações com as CEE gerassem mais controvérsia do que a esperada (Walia *et al.* 2011).

Estudos anteriores mostraram que o estado “terminalmente diferenciado” das células humanas não estava fixado, podia ser alterado, e que a expressão dos genes previamente silenciados, típico de outros estados diferenciados, podia ser induzida (Blau e Baltimore 1991; Bhutani *et al.* 2010; Yamanaka e Blau 2010). Como consequência, as linhagens de células estaminais pluripotentes podem ser geradas diretamente, a partir de células somáticas adultas completamente diferenciadas, usando abordagens alternativas como a transferência nuclear, a fusão celular e a reprogramação direta. A reprogramação nuclear inicia-se quando o núcleo de uma célula somática diferenciada é transplantado para um oócito enucleado, levando à clonagem da célula somática original. Estas experiências mostraram claramente que a diferenciação celular necessita apenas de alteração na expressão dos genes, não no conteúdo do gene, e este processo de diferenciação pode ser totalmente revertido (Yamanaka e Blau 2010). Os heterocários constituem outra abordagem complementar à reprogramação nuclear e envolvem a fusão celular, na qual dois ou mais tipos de células se fundem para formar uma entidade singular. Foi mostrado que a reprogramação em heterocários foi influenciada pelo estado de metilação do ADN, o tecido de origem e pelo rácio relativo dos núcleos, que dita o balanço dos reguladores (Blau e Baltimore 1991; Zhang *et al.* 2007). Ao

usar interespécies de heterocários (CEE de ratos, fibroblastos humanos), Bhutani *et al.* (2010) mostraram que a IAD de mamífero é necessária para a demetilação ativa do ADN e iniciação da reprogramação nuclear para a pluripotência em células somáticas humanas (Bhutani *et al.* 2010).

Têm sido exercidos esforços intensivos para identificar os principais fatores de transcrição dos fenótipos da célula, para suportar a ideia de que um pequeno número de principais fatores de transcrição podem controlar o estado da célula em vários tipos de células, incluindo a reprogramação e a transdiferenciação (Young 2011). Somente em 2006 as tentativas para identificar os principais reguladores do estado das CEE chegaram a um patamar com o estudo de Shinya Yamanaka e dos seus colegas, que mostraram que a combinação de somente quatro fatores de transcrição poderiam gerar, a partir dos fibroblastos de rato, células pluripotentes semelhantes às CEE (Takahashi e Yamanaka 2006). As células geradas são chamadas de células estaminais pluripotentes induzidas (CEPi). A descoberta da reprogramação fator-direto teve um efeito sísmico na Biologia Celular Estaminal e nas suas potenciais aplicações (Wilmot *et al.* 2011). Hoje em dia, muitos sistemas fundamentais em Biologia estão a mudar, para aceitar que as células maduras do corpo podem ser revertidas para um estado embrionário sem a ajuda de óvulos ou embriões.

Por este motivo, a reprogramação não só contorna a necessidade do uso de embriões para reunir e cultivar as CEE, como também vem com a vantagem adicional de contornar os problemas imunológicos associados aos enxertos, que incluem a rejeição do transplante e a doença do enxerto contra hospedeiro (DECH). Por outro lado, a eficácia desta técnica é somente uma gota no oceano, havendo ainda muitas barreiras técnicas no processo. Este livro vai focar-se na história das CEPi, que no início deste século abriram uma nova era na Biologia Celular.

Referências bibliográficas

- Bhutani N et al (2010) Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* 463(7284): 1042-1047
- Blau HM, Baltimore D (1991) Differentiation requires continuous regulation. *J Cell Biol* 112(5): 781-783
- Briggs R, King TJ (1952) Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Pro Natl Acad Sci USA* 38(5):455-463
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819):154-156
- Gurdon JB et al (1958) Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 182(4627):64-65
- Huang S (2009) Reprogramming cell fates: reconciling rarity with robustness. *Bioessays* 31(5):546-560
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast culture by defined factors. *Cell* 126(4):663-676
- Thomson JA et al (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145-1147
- Walia B et al (2011) Induced pluripotent stem cells: fundamentals and applications of the reprogramming process and its ramifications on regenerative medicine. *Stem Cell Rev Jun* 14. [Epub ahead of print]
- Wilmot I et al (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385(6619):810-813
- Wilmot I et al (2011) The evolving biology of cell reprogramming. *Philos Trans R Soc Lond B Biol*

Sci 366(1575):2183-2197

Yamanaka S, Blau HM (2010) Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. Nature 465(7299):704-712

Young RA (2011) Control of the embryonic stem cell state. Cell 144(6):940-954

Zhang F et al (2007) Active tissue-specific DNA demethylation conferred by somatic cell nuclei in stable heterokaryons. Proc Natl Acad Sci USA 104(11):4395-4400

Capítulo 2

Células pluripotentes

2.1 Células Pluripotentes Diferenciadas

As propriedades definidoras das CEE são: a capacidade de proliferar indefinidamente em compromisso com quaisquer linhagens celulares (auto-renovação) e a capacidade de diferenciarem linhagens de células das três camadas germinativas (pluripotência) (Evans e Kaufman 1981; Thomson *et al.* 1998). As CEE foram as primeiras células pluripotentes de embriões normais, derivados da massa celular interna (MCI) dos embriões pré-implantados, a serem isoladas (Evans e Kaufman 1981). Quando injetados em blastocistos de ratinhos, as CEE de ratinhos (mouse embryonic stem cells ou mESCs) contribuem com células para as três camadas germinativas e para a linhagem germinativa de animais quiméricos. No entanto, existem características moleculares e biológicas distintivas entre as CEE e os seus homólogos *in vivo* da MCI. As células da MCI não se autorrenovam e têm hipometilação global do genoma (Santo *et al.* 2002), enquanto que as CEE têm um potencial de proliferação ilimitado e têm caracteristicamente uma elevada metilação global do genoma (Meissner *et al.* 2008).

Apesar de há 25 anos as primeiras linhagens de mESCs terem sido derivadas a partir de camadas alimentadoras com base em culturas de blastocistos, os esforços subsequentes para estender esta abordagem a outros mamíferos têm sido relativamente mal sucedidos. As CEE humanas (hESCs) só puderam ser isoladas em 1998 (Thomson *et al.* 1998). As células estaminais embrionárias humanas e de ratos partilham características similares, como a origem da sua MCI e pluripotência, mas, por outro lado, existem diferenças entre si. As diferenças estão relacionadas com a sua morfologia, marcador de expressão, atividades de ligação do fator de transcrição e os requerimentos do fator de crescimento em condições de cultura. As mESCs dependem do fator inibidor de leucemia (LIF) e da proteína morfogenética óssea (BMP), enquanto que as hESCs dependem da actina e do fator de crescimento dos fibroblastos (FGF) (Thomson *et al.* 1998).

Tabela 1 Diferentes tipos de células pluripotentes e ações antagonistas das mesmas vias de sinalização, em diferentes estados de pluripotência.

	hESCs	EpiCE	mESCs
Estado de pluripotência	Semelhante à MCI	Semelhante ao epiblasto pós-implantado	Semelhante à MCI
Estado de maturidade	Primed	Primed	Naïve
Morfologia	Monocamada lisa	Monocamada lisa	Em forma de cúpula
Condições de Cultura	Activina A/bFGF	Activina A/bFGF	LIF/BMP4 2i
Estado de confirmação de pluripotência	Formação de teratoma	Formação de teratoma	Complementação tetraploide
Inativação do cromossoma X	XaXi	XaXi	Contribuição da linha germinativa XaXa
Sinalização BMP	Induz a diferenciação	Induz a diferenciação	(+LIF) Estabilizado
TGF-B & FGF2	Suporta a renovação	Suporta a renovação	Induz a diferenciação
Via de sinalização ERK 1/2	Requer	Requer	A autorrenovação é reforçada pela inibição

Em 2007, dois grupos independentes mostraram que as células pluripotentes também podiam ser derivadas do epiblasto do embrião implantado (Brons *et al.* 2007; Tesar *et al.* 2007). As células estaminais do epiblasto de rato (*Epiblast stem cells* ou EpiSC) são derivadas do epiblasto pós implantado de um embrião com 5,5 dias, na presença de bFGF e da actina (Tesar *et al.* 2007). Embora as EpiSCs sejam capazes de se diferenciar *in vitro* nos teratomas, incluindo os tecidos pertencentes às três células germinativas embrionárias, elas não contribuem para as quimeras.

Curiosamente, as hESCs partilham características definidoras com as EpiSCs, no entanto, derivam de embriões humanos pré implantados (Nichols e Smith 2009) (Tabela 1).

As linhagens de células pluripotentes também foram derivadas de outros tecidos embrionários e adultos. As células germinativas embrionárias (EGCs) foram derivadas das células germinativas primordiais (CGP) do embrião de gestação média (Matsui *et al.* 1992) e as células estaminais germinativas adultas (células germinativas masculinas e espermatogónias) (Surani 1999) foram geradas a partir do recém nascido transplantado (Kanatsu-Shinohara *et al.* 2004) e de células testiculares de ratinhos adultos (Guan *et al.* 2006).

Além disso, em 2008, Chou *et al.* reportaram células pluripotentes distintas derivadas do blastocisto, que foram definidas pelo FGF2, a actina e o BIO. A estas células os autores chamaram de FAB-SCs e mostraram que elas partilhavam marcadores EpiSCs, no entanto, as FAB-SCs eram incapazes de se diferenciar a não ser que fossem expostas ao LIF/BMP4 (Chou *et al.* 2008).

Com a descoberta das EpiSCs há um conceito emergente de que podem existir diferentes estados de pluripotência, e o conhecimento tanto da rede transcricional como das vias de sinalização tem sido vital para a descrição precisa e para a dissecação do estado pluripotente.

2.2 Rede Transcricional e Vias de Sinalização da Pluripotência

Os diferentes tipos de células pluripotentes podem ser caracterizados e classificados pelas suas diferentes necessidades de crescimento, propriedades de desenvolvimento e estados de pluripotência (Tabela 1):

1. Estado pluripotente semelhante à MCI: CEE derivadas da MCI, células germinativas embrionárias e células germinativas masculinas ou espermatogônias.
2. O estado de pós implantação semelhante ao epiblasto: EpiSCs.

Estes dois estados dependem das vias de sinalização que muitas vezes se antagonizam um ao outro (Hann *et al.* 2010b). Por outro lado, Nichols e Smith designaram as células pluripotentes como *na* e *primed*, de acordo com o seu estado de pluripotência (Nichols e Smith 2009). Quando isolado da MCI dos blastocistos pré implantados, na presença de LIF e BMP, as mESCs preencheram todos os critérios de pluripotência, portanto, foram aceites como estando no estado de pluripotência “na”. Por outro lado, as EpiSCs são definidas como células pluripotentes “primed” porque exibem somente alguns critérios de pluripotência.

À parte da sua contribuição para as quimeras do blastocisto, existem mais diferenças entre os estados de pluripotência *na* e *primed* (Tabela 1): Enquanto que as células pluripotentes *na* exibem baixa suscetibilidade para a especificação primordial germinativa e grande clonogenicidade de uma única célula, as células *primed* mostram o contrário. Enquanto que as colónias de mESC mostram morfologias compactas em forma de cúpula, tanto as hESCs como as EpiSCs crescem como uma camada lisa e os reguladores positivos de ambos os estados são o WNT e o IGF. As células pluripotentes *na* requerem sinalização LIF/Stat3 e BMP4, enquanto que as células pluripotentes *primed* necessitam de sinalização TGF- β , actina, FGF2 e ERK1/2. Curiosamente, os dois sinais antagonizam-se um ao outro: o BMP4 nas EpiSCs e o TGF- β , a actina, o FGF2 e o ERK1/2 nas células *na* induzem a diferenciação. Geralmente, as células pluripotentes *na* não expressam marcadores específicos de linhagem (FGF5, Blimp1, Cer 1), no entanto, estes marcadores são positivos em estados celulares *primed* com padrões de expressão heterogêneos. Além disso, as células pluripotentes *primed* expressam antígenos MHC de classe I, enquanto que os estados celulares *na* não. As CEE *na* contêm dois cromossomas X ativos (XaXa) em células femininas; em contraste, as EpiSCs *primed* já passaram pela inativação do cromossoma X (Nagy *et al.* 1990; Thomson *et al.* 1998; Ying *et al.* 2003; James *et al.* 2005; Brons *et al.* 2007; Tesar *et al.* 2007; Ying *et al.* 2008).

Estes estudos provaram que os estímulos extrínsecos são dispensáveis para a derivação, propagação e pluripotência das CEE. Também mostraram que as células têm um programa inato para a autorreplicação. Ying *et al.* demonstraram que o LIF e o BMP podem ser dispensados com inibidores de indução específicos das vias de sinalização. O LIF e pequenos inibidores moleculares de duas cinases proteicas, o ERK 1/2 e o GSK3 β (chamado “2i”), podem substituir o soro ao estimularem a via WNT, por isso, o 2i permite a manutenção das CEE em meio totalmente definido, sem células embrionárias alimentadoras. Os resultados foram interpretados como a indicação de que a pluripotência e o estado de

autorrenovação das CEE são o “estado fundamental”, ou seja, o estado padrão natural que não necessita ser mantido ativamente (Ying *et al.* 2008).

Em conjunto, as hESCs, as EpiSCs e as mESCs manifestam-se como potenciais tipos de células distintas e as hESCs podem estar mais estreitamente relacionadas com o epiblasto humano pós implantação (Wilmut *et al.* 2011). A geração de hESCs *na* permitirá criar novas oportunidades de pesquisas específicas para o paciente. Por outro lado, Guo *et al.* (2009) examinaram a interconversão entre as mESCs e as EpiSCs, e mostraram que as mESCs, quando expostas ao bFGF, podem rapidamente converter-se em EpiSCs. No entanto, as EpiSCs não mudam para CEE com meio de cultura definido. Somente a expressão forçada de Klf4, na presença de LIF e BMP, pode promover a conversão de EpiSCs em células semelhantes a CEE (Guo *et al.* 2009). Outro grupo, Bao e colegas (2009), demonstrou a reprogramação de células avançadas do epiblasto de embriões de ratinhos, com 5,5-7,5 dias de estado embrionário, para células semelhantes às CEE, em resposta à sinalização LIF-STAT3. Os autores também reportaram que essas CEE reprogramadas poderiam contribuir para tecidos somáticos e células germinativas em quimeras, ao contrário das EpiSCs (Bao *et al.* 2009). Em conjunto, é óbvio que a modulação da sinalização, por alterações ambientais, é suficiente para interconverter estes tipos de células estreitamente relacionadas, indicando que os fatores de crescimento extrínsecos podem ser dispensáveis para sustentar o estado pluripotente (Ying *et al.* 2008). Além disso, Hanna *et al.* (2010a) converteram as CEE, pela indução ectópica do Oct4, Klf4 e Klf2, combinado com LIF, inibidor de GSK3 β e inibidor de MEK, a um estado ainda mais imaturo com um cromossoma X (XaXa) ativo (Hanna *et al.* 2010a). Estas hESCs convertidas têm semelhantes propriedades de crescimento, perfis de expressão de genes e dependência da via de sinalização com as mESCs. Curiosamente, a apoiar esta ideia está a recente criação das EpiSCs derivadas de pré-implantação, cultivadas em condições de cultura das CEE humanas (Najm *et al.* 2011). Também foi demonstrado que as hESCs com dois cromossomas X (XaXa) ativos podem ser geradas em condições de hipoxia (5% oxigénio) (Lengner *et al.* 2010).

Embora os estados pluripotentes *na* e *primed* sejam inconvertíveis um no outro e possam ser estabilizados através de condições de cultura apropriadas, não foi observada a coexistência estável destes estados nas mesmas condições de cultura, tanto em ratos como em humanos. No entanto, foi proposto que fatores extrínsecos e intrínsecos específicos podem induzir transições entre ambos os estados. Embora o estado *na*, capturado por Hanna *et al.*, possa ser mantido somente por passagens limitadas, este estudo está a fornecer ideias claras de que as condições de crescimento devem ser melhoradas, de maneira a retomar o estado fundamental *na* em células humanas não mudadas geneticamente (Hanna *et al.* 2010b).

Têm sido efetuados esforços consideráveis para dissecar as funções moleculares dos principais fatores de pluripotência na manutenção da pluripotência e no estabelecimento da associação molecular entre tipos de células pluripotentes. Como já mencionado, uma vez que já houve progressos importantes na dissecação das vias de sinalização de culturas mediadas; agora é o momento propício para perceber como a sinalização pode ser integrada na rede transcricional.

2.2.1 Rede Transcricional da Pluripotência

As CEE têm sido investigadas através de estudos de larga escala genómica e de interação da proteína do ADN para estudos mecânicos de fatores de transcrição individuais. A somar aos requerimentos de sinalização, certos fatores de transcrição desempenham papéis importantes no estabelecimento e manutenção da pluripotência.

Os mais importantes fatores de transcrição do estado de pluripotência nas CEE são o Oct4, o Sox2 e o Nanog, e são chamados fatores de transcrição nucleares (Silva e Smith

2008). Os fatores de transcrição reconhecem sequências específicas de ADN e, ou ativam ou previnem a transcrição. Ambos se ligam a elementos do ADN promotor proximal e a regiões mais distais (Young 2011).

A especificação inicial das células pluripotentes *in vivo* requer a expressão Oct4 (Nichols *et al.* 1998). Embora a perda da expressão Oct4 leve à diferenciação da trofoectoderme, grandes níveis induzem a diferenciação para mesoderme e endoderme (Niwa *et al.* 2000). O Oct4 funciona formando heterodímeros com o Sox2 nas CEE. O Sox2 liga-se a sequências de DNA adjacentes aos sítios de ligação do Oct4 (Avilion *et al.* 2003; Chambers and Tomlinson 2009). O Sox2 é necessário para a manutenção do epiblasto. Por outro lado, o Nanog promove um estado CEE estável e indiferenciado, e é necessário para o desenvolvimento da pluripotência em células da MCI (Silva e Smith, 2008). As CEE com déficit de genes Nanog são mais propensas à diferenciação, mas não perdem pluripotência *per se*. O Nanog é essencial para a especificação da célula pluripotente, durante o desenvolvimento normal, e para a indução da pluripotência para finalizar a reprogramação da célula somática durante a indução da pluripotência (Theunissen e Silva 2011). Theunissen e Silva propuseram que o Nanog atua como um interruptor para ligar o programa de pluripotência *na* em células de mamíferos (Theunissen e Silva 2011).

Recentemente, também o Young sugeriu que há dois conceitos dominantes para a nossa compreensão dos fatores de transcrição fundamentais no controlo do estado das CEE (Young, 2011):

- (1) Os fatores de transcrição fundamentais funcionam em conjunto para regular positivamente os seus próprios promotores, formando um laço autorregulador interligado.
- (2) Os fatores fundamentais co ocupam e ativam a expressão dos genes necessários à manutenção do estado das CEE, enquanto contribuem para a repressão dos genes que codificam os fatores de transcrição específicos de linhagem, cuja ausência ajuda a prevenir a saída do estado de pluripotência.

Este laço autorregulador interligado pode gerar um estado biestável para as CEE: quando os fatores estão expressos em níveis apropriados, o programa do gene de expressão *feedback* positivo controlado entra em ação. Em alternativa, o programa de diferenciação funcional é ativado quando nenhum dos fatores de transcrição está disponível (Young 2011).

Nos últimos anos, tem havido esforços consideráveis para compreender a pluripotência ao nível do genoma, bem como ao nível dos sistemas, para fornecer uma compreensão global do estado fundamental do estado das CEE e da diferenciação. Assim, a descoberta da reprogramação de células somáticas de mamíferos para um estado pluripotente, pela superexpressão de somente quatro fatores de transcrição, teve um efeito tremendo na compreensão da biologia básica da célula.

Referências bibliográficas

- Avilion AA et al (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17(1):126–140
- Bao S et al (2009) Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* 461(7268):1292–1295
- Brons IG et al (2007) Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448(7150):191–195
- Chambers I, Tomlinson SR (2009) The transcriptional foundation of pluripotency. *Development* 136(14):2311–2322
- Chou YF et al (2008) The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in

novel blastocyst-derived stem cells. *Cell* 135(3):449–461

Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819):154–156

Guan K et al (2006) Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 440(7088):1199–1203

Guo G et al (2009) Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* 136(7):1063–1069

Hanna J et al (2010a) Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(20):9222–9227

Hanna J et al (2010b) Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(20):9222–9227

James D et al (2005) TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 132(6):1273–1282

Kanatsu-Shinohara M et al (2004) Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119(7):1001–1012

Lengner CJ et al (2010) Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell* 141(5):872–883

Matsui Y et al (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70(5):841–847

Meissner A et al (2008) Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 454(7205):766–770

Nagy A et al (1990) Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 110(3):815–821

Najm FJ et al (2011) Isolation of epiblast stem cells from preimplantation mouse embryos. *Cell Stem Cell* 8(3):318–325

Nichols J, Smith A (2009) Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4(6):487–492

Nichols J et al (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95(3):379–391

Niwa H et al (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24(4):372–376

Santos F et al (2002) Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 241(1):172–182

Silva J, Smith A (2008) Capturing pluripotency. *Cell* 132(4):532–536

Surani MA (1999) Reprogramming a somatic nucleus by trans- modification activity in germ cells. *Semin Cell Dev Biol* 10(3):273–277

Tesar PJ et al (2007) New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448(7150):196–199

Theunissen TW, Silva JC (2011) Switching on pluripotency: a perspective on the biological requirement of Nanog. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2222–2229

Thomson JA et al (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145–1147

Wilmot I et al (2011) The evolving biology of cell reprogramming. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2183–2197

Ying QL et al (2003) BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115(3):281–292

Ying QL et al (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453(7194):519–523

Young RA (2011) Control of the embryonic stem cell state. *Cell* 144(6):940–954

Capítulo 3

Células estaminais pluripotentes induzidas (CEPi)

3.1 Geração da Primeira CEPi

Takahashi e Yamanaka (2006) mostraram que a superexpressão dos fatores de transcrição definidos podem também converter as células (ou núcleos) para um estado pluripotente. A ideia era a de que os fatores que mantêm a pluripotência nas CEE talvez pudessem induzir a pluripotência em células somáticas. Eles testaram 24 fatores de transcrição com base na importância do seu papel nas mESCs e introduziram combinações desses genes em fibroblastos de ratinhos, através da transdução retroviral. As células transportavam um gene de resistência a antibióticos que só seria expresso quando o gene da proteína F-box 15 (Fbxo15) estivesse ativo. Eles conceberam esta experiência de maneira a que este gene de resistência a antibióticos também pudesse ser ligado se a pluripotência fosse induzida pela combinação destes 24 genes candidatos. Surpreendentemente, descobriram que somente quatro destes fatores eram suficientes para gerar colônias semelhantes às CEE. A combinação de genes era: *octamer 3/4* (Oct4, também conhecido como Pou5f1), *SRY box* contendo o gene 2 (Sox2), *Kruppel-like factor 4* (Klf4) e c-Myc (mais tarde chamado de OKSM). Estas células reprogramadas foram chamadas de células estaminais pluripotentes induzidas (CEPi) (Takahashi e Yamanaka, 2006).

Embora as células que foram selecionadas pela sua capacidade de expressar o Fbxo15 tivessem parencas morfológicas com as CEE, propriedades de crescimento, expressão de importantes marcadores genéticos das CEE, como o SSEA-1 e o Nanog, e a capacidade de formar teratomas em ratinhos imunodeficientes, elas também divergiam em termos do perfil de expressão genética global e em certos padrões de metilação do ADN. As células falharam na produção de ratinhos quiméricos adultos, quando injetadas em embriões de ratinhos na fase inicial. Estas características indicaram que estas CEE de “primeira geração” não estavam totalmente reprogramadas (Yamanaka 2009a, b). Logo depois, com o melhoramento dos pontos finais para o processo de reprogramação, tais como a utilização do Nanog ou Oct4 como seletores, em vez do Fbxo15, eles geraram colônias com os genes de pluripotência reativados. Estas células eram também semelhantes às CEE e podiam contribuir para quimeras adultas (Okita *et al.*, 2007). Um ano depois também foram reprogramados fibroblastos humanos com os mesmos fatores de transcrição genéticos (Takahashi *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). A seguir e de forma independente, vários grupos replicaram a reprogramação de células humanas fetais, células neonatais e células somáticas adultas em CEPi (Aasen *et al.* 2008; Lowry *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008^a, b). Como uma indicação de que os caminhos de transcrição de pluripotência foram bem conservados durante a evolução, as CEPi foram geradas a partir de várias espécies, incluindo a humana, o macaco Rhesus e os murinos (Takahashi *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009). Mais recentemente, foi mostrado que as linhagens de CEPi podiam gerar ratinhos “totalmente

CEPi” após a injeção em blastocistos tetraploides (Boland *et al.*, 2009; Kang *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2009).

3.2 Reprogramação

3.2.1 Fator de Entrega em Células Alvo

As CEPi oferecem células de doença e células específicas do paciente, com o conhecimento da história clínica do dador, e podem ser feitas com células obtidas de qualquer faixa etária e doenças, como as doenças crônicas em pacientes mais velhos. As técnicas usadas para gerar as CEPi podem afetar a eficiência da reprogramação e a qualidade das CEPi resultantes. Os métodos de reprogramação podem ser divididos em várias classes, de acordo com o modo de integração do material genético exógeno no genoma do hospedeiro ou da abordagem não integrativa (Stadtfeld e Hochedlinger, 2010).

3.2.1.1 Abordagens de Integração

Retrovírus

A entrega dos fatores de Yamanaka (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, OKSM), em ratos e fibroblastos humanos, foi originalmente alcançada usando um retrovírus derivado do vírus da leucemia murina de Moloney (MMLV). Eles integraram-se de forma estável no genoma da célula do hospedeiro (Takahashi e Yamanka, 2006; Okita *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007). A eficiência da geração das CEPi usando retrovírus derivados da MMLV é de ~0,1%, em fibroblastos embrionários de ratinhos, e de ~0,01%, em fibroblastos humanos (Gonzalez *et al.*, 2011). O silenciamento é importante de forma a obter CEPi genuínas. Somente uma CEPi que tenha *upregulated* a rede de pluripotência endógena do gene e *downregulated* a expressão do transgene pode ser realmente considerada como totalmente reprogramada (Gonzalez *et al.*, 2011). No entanto, as CEPi derivadas de retrovírus têm inúmeros sítios de integração do transgene no genoma do hospedeiro e, por isso, o silenciamento incompleto do transgene compromete o potencial desenvolvimento das CEPi (Brambrink *et al.*, 2008). Para além disso, a expressão residual do transgene ou uma reativação tardia dos fatores de transcrição, aplicados exogenamente, pode causar a formação de tumores numa escala alarmante (Okita *et al.*, 2007; Miura *et al.*, 2009).

Lentivírus

Tendo uma maior capacidade de clonagem e eficiência infecciosa do que os retrovírus baseados na MMLV, os vetores lentivirais de entrega também têm sido utilizados para expressar os fatores de reprogramação (Blelloch *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). A vantagem é que eles podiam infectar tanto as células divisíveis como as não divisíveis e, embora a sua eficiência reprogramadora seja comparável à dos retrovírus derivados da MMLV, o silenciamento dos lentivírus é menos efetivo nas CEPi que eles geram (Yao *et al.*, 2004). Os vetores lentivirais constitutivos não podiam resolver o problema porque eles foram reprimidos de maneira menos eficiente e causaram um bloqueio na diferenciação (Blelloch *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007).

Os *inducible lentivirus systems* não dependem do fator de entrega direta no alvo de entrega. Os sistemas de reprogramação “secundários” usam clones de CEPi “primários”,

gerados com vetores ou *transposons* lentivirais induzidos por *doxycycline* (Dox). Essas células CEPi primárias depois diferenciam-se em células somáticas geneticamente homogêneas, usando diferenciação *in vitro* para células humanas ou injeção de blastocistos para ratinhos (Maheri *et al.*, 2008; Wernig *et al.*, 2008). Uma vez que as células primárias são induzidas por um lentivírus contendo uma cassete de expressão de fatores de transcrição, sob o controle do operador induzível Dox, a formação de CEPi “secundárias” é desencadeado quando elas são cultivadas num meio contendo *doxycycline* (Maherali *et al.*, 2008; Wernig *et al.* 2008). Embora a eficiência do sistema dependa do tipo de célula alvo utilizada, é geralmente superior à da infecção primária (Stadtfeld e Hochedlinger, 2010). Stadtfeld e Hochedlinger (2010) também reportaram que os sistemas secundários têm duas grandes vantagens: a reprogramação de grandes quantidades de células geneticamente homogêneas, especialmente daquela que é difícil de cultivar ou transduzir; e facilita a comparação das CEPi geneticamente semelhantes, derivadas de diferentes células somáticas. No entanto, ainda existe uma desvantagem, que são os padrões de expressão heterogêneos em células secundárias, por causa dos transgenes lentivirais que causam uma triagem larga dos clones primários das CEPi (Stadtfeld e Hochedlinger, 2010). As cadeias de ratinhos “reprogramáveis”, que podem transportar *backgrounds* mutantes desejados, podem ter um efeito surpreendente para os estudos mecanicistas de patologias de doenças (Carey *et al.*, 2010; Stadtfeld *et al.*, 2010).

Single vector. Os vetores lentivirais ou retrovirais projetados para exprimirem cassetes policistronicas, que codificam todos os fatores OKSM, foram mais eficientes na infecção de diferentes tipos de células somáticas do que os vetores de fator de expressão únicos (Carey *et al.*, 2009). Embora este método minimize a integração genômica, ainda existe um risco tumoral após a implantação. Em particular, o *c-Myc* é um oncogene bem conhecido e a sua reativação pode dar origem à formação tumoral de derivação transgênica em ratinhos quiméricos (Okita *et al.*, 2007). Embora a remoção do transgene *c-Myc* do *cocktail* de reprogramação tenha reduzido ligeiramente a eficiência, os ratinhos quiméricos gerados com as CEPi sem *c-Myc* não causaram a formação de tumores avançados (Nakagawa *et al.*, 2008). No entanto, a super-expressão do Oct4 e do Klf4 pode ainda causar a formação de tumores e a inserção de retrovírus pode perturbar a estrutura genética do hospedeiro e aumentar o risco de cancro (Okita e Yamanaka, 2010).

As técnicas standard de transfecção do ADN, como o uso de lipossomas ou da electroporação, podem ser boas alternativas para evitar o uso de vetores virais. No entanto, a eficiência da transdução é muito mais baixa do que a transfecção viral (Gonzalez *et al.*, 2011).

3.2.1.2 Abordagens de excisão

Um método livre de vírus, utilizando vetores episomais baseados no oriP/EBNA1 (Epstein-Barr antigene nuclear 1) ou um sistema de reprogramação de vetores singulares baseados no *piggyBac* (PB) têm sido usados com sucesso para reprogramar fibroblastos humanos (Kaji *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009). Outro método excisivo usa vetores lentivirais e transgenes lineares excisivos *Cre/loxP* que deixam uma cicatriz no genoma após a eliminação do Cre. Quando eram usados vetores policistronicos, esta abordagem produziu uma geração eficiente de CEPi a partir de diferentes tipos de células (Chang *et al.*, 2009). Entre as metodologias integrativas, embora só o sistema PB garanta uma eliminação precisa, ainda precisa de verificação das linhas supressas (Park *et al.*, 2008b).

Embora o uso do Cre delével ou de lentivírus induzíveis tenha resolvido alguns problemas, os sistemas virais ainda carecem da segurança necessária para aplicações terapêuticas.

3.2.1.3 Abordagens não integrativas

Para minimizar o risco de ruptura cromossômica, os protocolos reprogramáveis foram aperfeiçoados para eliminar a integração genética. Para este propósito foram desenvolvidos três abordagens diferentes. A primeira utiliza vetores integrativos que podem ser subsequentemente removidos do genoma, como já falamos. A segunda usa vetores livres de integração e a última não utiliza vetores ácido-base nucleicos (Stadtfeld e Hochedlinger, 2010). Infelizmente todas elas são geralmente ineficientes e pouco reprodutíveis. (Gonzalez *et al.*, 2011).

Entre os métodos que promovem a reprogramação, sem integração, estão os vetores adenovirais, que medeiam a expressão transitória dos fatores reprogramadores exógenos, sem integração genômica. Uma das primeiras tentativas para gerar CEPi livres de integração, a partir dos hepatócitos de ratinhos, foi reportada por Stadtfeld *et al.* (2008), que usou vetores adenovirais não integrativos. Usando vetores semelhantes, Okita *et al.* (2008) e Zhou e Freed (2009), geraram linhagens de CEPi livres de integração, a partir de fibroblastos embrionários de ratinhos e de fibroblastos fetais humanos, respectivamente. Uma vez que com estes sistemas não há integração genômica, isto é a prova de que a expressão transitória dos fatores de reprogramação é suficiente para gerar CEPi a partir de células somáticas (Stadtfeld e Hochedlinger, 2010). Além disso, um forte apoio a esta conclusão veio de experiências recentes, que mostram a ausência de sítios de integração comuns em CEPi produzidas com retrovírus ou lentivírus (Varas *et al.* 2009; Winkler *et al.* 2010). Mais recentemente, foram derivadas CEPi de fibroblastos humanos, usando sistemas de entrega do gene viral Sendai (Fusaki *et al.* 2009), assim como vetores *polycistronic minicircle* (Jia *et al.*, 2010) e episomas selecionados autorreplicantes (Yu *et al.*, 2009).

Métodos livres de ADN

Mais recentemente, e de maneira a eliminar por completo os vetores plasmídeos ou virais, as CEPi foram geradas ao introduzir-se quatro fatores de reprogramação sob a forma de proteínas recombinantes purificadas (Zhou *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009^a). No entanto, a sua eficiência é extremamente baixa, possivelmente devido à baixa eficiência de transdução e expressão instável (Okita e Yamanka, 2010). Mais recentemente, Warren *et al.* (2010) mostrou uma reprogramação mais eficiente ao usar mRNA sintético modificado, que não modifica o genoma. As CEPi formadas são chamadas de células pluripotentes induzidas-ARN (RiPSCs). Embora o protocolo seja tecnicamente muito complexo, uma vez que esta tecnologia é baseada no ARN, ele elimina por completo o risco de integração genômica e de mutagêneses de inserção inerente a todas as metodologias de ADN. Esta tecnologia tem a maior eficiência e cinética até à data (Walia *et al.*, 2011).

Embora os métodos que usam vetores não integrantes, elementos genéticos de excisão e pequenos químicos e/ou proteínas não deixem pegada genética, a eficiência da geração das CEPi com eles varia entre os 0,0001 e os 0,0018%, o que é aproximadamente três ordens de magnitude mais baixo do que aqueles obtidos através dos vetores integrantes (0,1-1%) (Stadtfeld e Hochedlinger, 2010). Por isso, as eficiências da reprogramação têm tentado aumentar com fatores de suplementação definidos por genes adicionais ou químicos pequenos (Masip *et al.*, 2010).

3.2.1.4 Reprogramação Química

As moléculas pequenas são substâncias que ocorrem naturalmente ou são compostos inteiramente produzidos pelo homem. Elas têm vindo a ser produzidas e avaliadas quanto à atividade em diversos organismos, sistemas de cultura celular e vias moleculares. A sua facilidade de uso, especificidade, dose-dependente, os efeitos rápidos e reversíveis, e o tempo

preciso e o controlo funcional *in vivo*, fez delas uma das ferramentas mais efetivas na pesquisa biomédica (Efe e Ding, 2011). Têm-nas utilizado ultimamente para facilitar a reprogramação celular somática. Efe e Ding (2011) explicaram como as moléculas pequenas melhoram a reprogramação: algumas têm um efeito global na plasticidade celular, enquanto que as outras podem modular uma via de sinalização específica para substituir um ou mais fatores de reprogramação. Por outro lado, também há alguns compostos que funcionam para ambas as categorias (Efe e Ding, 2011). Omitir oncogenes (Klf4 e cMyc) (Nakagawa *et al.*, 2008; Utikal *et al.* 2009; Kim *et al.*, 2009b) ou substituir um ou dois fatores de transcrição por químicos pequenos, como o VPA (um inibidor da histona deacetilase) (Huangfu *et al.*, 2008), não só oferece um potencial clínico mais seguro como também aumenta significativamente a eficiência das CEPI derivadas. Mais notável, Mali *et al.* (2010) tem mostrado que baixos níveis de butirato (um inibidor da HDAC) aumentou a eficiência da reprogramação até cerca de 50 vezes. Além disso, Lin *et al.* (2009) reportaram que um tratamento combinado de fibroblastos com o inibidor de Alk5, SB431542, o inibidor de MEK, PD0325901, e o thiazovivin causou uma grande melhoria (mais de 200 vezes) na eficiência de reprogramação do OKSM. (Li *et al.*, 2009).

3.2.1.5 Micro-ARNs (miARNs) em Reprogramação

Os miARNs são 22 nt pequenos de ARN não codificante, que regulam a expressão dos alvos *downstream* pela destabilização e inibição de tradução do ARN mensageiro (ARNm) (Subramanyam e Blelloch, 2011). Eles são carregados para o complexo RISC (RNA-induced silencing complex) para exercerem um silenciamento da função global do gene (Chu e Rana, 2007). Múltiplos miARN são muitas vezes encontrados em grupos no genoma e expressos de uma maneira tipo específica na célula, semelhante aos fatores de transcrição. Uma vez que um único miARN pode atingir centenas de ARNm, a expressão de um único miARN poderia regular poderosamente a decisão do destino da célula (Sridharan e Plath, 2011). Semelhante a pequenos compostos, os miARNs também são mostrados como capazes de influenciar a eficiência da reprogramação. Anokye-Danso *et al.* (2011) reportaram recentemente que a entrega lentiviral do grupo miR-302, que inclui o miRs-302a-d e o miR-367, por si só pode produzir CEPI de ratinhos e humanas a partir de fibroblastos. Para além disso, Miyoshi *et al.* (2011) reprogramaram células estromais adiposas ao transferir repetidamente um cocktail de sete miARNs pertencentes às famílias miR-302, miR-200 e miR369. No entanto, quando comparado com a entrega viral de percursores do miARN, no estudo de Anokye e colegas, a eficiência da reprogramação, em estudos avançados, foi consideravelmente mais baixa. Tem sido sugerido que, em adição às suas atividades populares nos processos de reprogramação, a triagem de células de um tipo específico de miARNs para atividades de transdiferenciação pode também ser muito útil para modular eventos de conversão de linhagem (Sridharan e Plath, 2011).

Há muitas técnicas alternativas para a reprogramação. Por exemplo, Zhong *et al.* (2011) testaram dois genes indutores de apoptoses, chamados “genes suicidas induzíveis” ou simplesmente “genes suicidas”, para ver se eles estão disponíveis para um potencial método de salvaguarda das células CEPI. Eles avaliaram a capacidade de mudança da morte das células, de dois sistemas de suicídio dos genes/drogas, *YCD/5-FC* e *iCaspase/AP20187*, em CEPI primatas não humanos (*Macaca nemestrina*), tanto *in vitro* como *in vivo*. Os resultados do estudo mostraram que uma combinação do gene/pró-droga suicida pode salvaguardar as CEPI a superarem a transformação oncogénica potencial e/ou a persistência das células pluripotentes em terapias celulares relacionadas com as CEPI. (Zhong *et al.*, 2011).

Yamanaka e a sua equipa reportaram, recentemente, um método não integrativo usando a supressão do p53 e o L-Myc não transformador com vetores plasmídicos

epissômicos, para reprogramar o *HLA* homozigótico em CEPi. Eles usaram linhagens de polpa dentária de dois antígenos de leucócitos humanos (HLA) putativos, de doadores homozigóticos que correspondem a ~20% da população japonesa nos principais loci HLA. Como mostrado neste estudo, as células da polpa dentária oferecem fontes seguras para alotransplantes, especialmente para casos em que é provável que seja necessário um transplante logo após uma lesão (Okita *et al.*, 2011; Yildirim *et al.*, 2011).

Referências bibliográficas

- Aasen et al (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26(11):1276-1284
- Anokye-Danso F et al (2011) Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 8(4):376-388
- Blelloch R et al (2007) Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell* 1(3):245-247
- Boland MJ et al (2009) Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature* 461(7260):91-94
- Brambrink T et al (2008) Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2(2):151-159
- Carey BW et al (2009) Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(1):157-162
- Carey BW et al (2010) Single-gene transgenic mouse strains for reprogramming adult somatic cells. *Nat Methods* 7(1):56-59
- Chang CW et al (2009) Polycistronic lentiviral vector for "hit and run" reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27(5):1042-1049
- Chu CY, Rana TM (2007) Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol* 213(2):412-419
- Efe JA, Ding S (2011) The evolving biology of small molecules: controlling cell fate and identity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2208-2221
- Fusaki N et al (2009) Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85(8):348-362
- Gonzalez F et al (2011) Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet* 12(4):231-242
- Huangfu D et al (2008) Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26(11):1269-1275
- Jia F et al (2010) A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 7(3):197-199
- Kaji K et al (2009) Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458(7239):771-775
- Kang L et al (2009) iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell* 5(2):135-138
- Kim D et al (2009a) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4(6):472-476
- Kim JB et al (2009b) Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461(7264):649-653
- Li W et al (2009) Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 4(1):16-19
- Lin T et al (2009) A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods* 6(11):805-808
- Liu H et al (2008) Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 3(6):587-590
- Lowry WE et al (2008) Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(8):2883-2888

Maherali N et al (2008) A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3(3):340-345

Mali P et al (2010) Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes. *Stem Cells* 28(4):713-720

Masip M et al (2010) Reprogramming with defined factors: from induced pluripotency to induced transdifferentiation. *Mol Hum Reprod* 16(11):856-868

Miura K et al (2009) Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 27(8):743-745

Miyoshi N et al (2011) Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 8(6):633-638

Nakagawa M et al (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26(1):101-106

Okita K, Yamanaka S (2010) Induction of pluripotency by defined factors. *Exp Cell Res* 316(16):2565-2570

Okita K et al (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448(7151):313-317

Okita K et al (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322(5903):949-953

Okita K et al (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8(5):409-412

Park IH et al (2008a) Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451(7175):141-146

Park IH et al (2008b) Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134(5):877-886

Sridharan R, Plath K (2011) Small RNAs loom large during reprogramming. *Cell Stem Cell* 8(6):599-601

Stadtfeld M, Hochedlinger K (2010) Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 24(20):2239-2263

Stadtfeld M et al (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322(5903):945-949

Stadtfeld M et al (2010) A reprogrammable mouse strain from gene-targeted embryonic stem cells. *Nat Methods* 7(1):53-55

Subramanyam D, Blelloch R (2011) From microRNAs to targets: pathway discovery in cell fate transitions. *Curr Opin Genet Dev* 21(4):498-503

Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast culture by defined factors. *Cell* 126(4):663-676

Takahashi K et al (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861-872

Utikal J et al (2009) Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci* 122(Pt 19):3502-3510

Varas F et al (2009) Fibroblast-derived induced pluripotent stem cells show no common retroviral vector insertions. *Stem Cells* 27(2):300-306

Warren L 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

Walia B et al (2011) Induced pluripotent stem cells: fundamentals and applications of the reprogramming process and its ramifications on regenerative medicine. *Stem Cell Rev Jun* 14. [Epub ahead of print]

Wernig M et al (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448(7151):318-324

Wernig M et al (2008) A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol* 26(8):916-924

Winkler T et al (2010) No evidence for clonal selection due to lentiviral integration sites in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 28(4):687-694

Yamanaka S (2009a) Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 460(7251):49-52

Yamanaka S (2009b) A fresh look at iPS cells. *Cell* 137(1):13-17

Yao S et al (2004) Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications. *Mol Ther* 10(1):27-36

Yildirim S et al (2011) Tooth regeneration: a revolution in stomatology and evolution in regenerative medicine. *Int J Oral Sci* 3(3):107-116

Yu J et al (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318(5858):1917-1920

Yu J et al (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324(5928):797-801

Zhao XY et al (2009) iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 461(7260):86-90

Zhong B et al (2011) Safeguarding Nonhuman Primate iPS Cells With Suicide Genes. *Mol Ther* 19(9):1667-1675

Zhou W, Freed CR (2009) Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27(11):2667-2674

Zhou H et al (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4(5):381-384

Capítulo 4

Mecanismos Moleculares de Pluripotência.

4.1 Passos na Reprogramação

Combinado com análise imagiológica ao vivo, vários sistemas de expressão induzível por tetraciclina para os fatores reprogramadores estão a permitir a sondagem de ideais mecanicistas da reprogramação. Está agora a ser sugerido que a reprogramação bem sucedida necessita de transição progressiva, através de passos chave intermédios (Papp e Plath, 2011; Plath e Lowry, 2011; Wali *et al.*, 2011).

4.1.1 Aumento na Taxa de Divisão Celular

A imagiologia de elevada resolução ao longo do tempo possibilitou saber que o primeiro evento característico durante a reprogramação dos fibroblastos é o aumento da taxa de divisão celular (Smith *et al.*, 2011). Indicou que certos processos celulares ou eventos acontecem na célula antes dos transgenes exógenos chegarem ao genoma para induzir a pluripotência (Jopling *et al.*, 2011). Além disso, foi mostrado que a supressão da apoptose e da senescência também contribui para o sucesso da reprogramação, especialmente o silenciamento do p53 e p21 ou CDKN2A tem sido observado aquando da reprogramação (Kawamura *et al.*, 2009; Marion *et al.*, 2009). Por isso, pensa-se que a apoptose, a senescência e a suspensão do ciclo celular são barreiras à reprogramação (Papp e Plath, 2011). Contudo, o estudo usou a análise de uma única célula e mostrou que embora a proliferação seja induzida em mais células do que na amostra de controlo, a maioria das esgotadas células p53 minaram o caminho da reprogramação tardia e a eficiência resultante da reprogramação foi muito baixa quando normalizada para o número de células que responderam inicialmente (Smith *et al.*, 2010).

Esta variação considerável entre células em resposta à reprogramação induzida pode ser mostrada com a ajuda da experiência de classificação celular para o Thy1 (um marcador para o fenótipo dos fibroblastos). No estudo de Stadtfeld *et al.* (2008b) foi mostrado que, embora metade das células tenha perdido a expressão Thy1 após cinco dias de tratamento, somente uma pequena fração dessas células foram totalmente reprogramadas no final do processo. No entanto, Hanna *et al.* (2009) mostraram que a indução estendida do transgene de expressão pode induzir a maioria, se não todas, das células para CEPi.

4.1.2 Mudança Morfológicas

As células de ciclo rápido ficam mais pequenas com o tempo e continuam a crescer como monocamadas. Embora a maioria das células que expressam os fatores de reprogramação não induzam com sucesso, a primeira mudança morfológica dos eventos de reprogramação corretos continua a ser semelhante a fibroblastos e muitas vezes sofrem apoptose, senescência e suspensão do ciclo celular (Plath e Lowry, 2011).

As CEE e os seus homólogos *in vivo*, as células progenitoras do epiblasto do blastocisto de pré-implantação, são epiteliais por natureza, portanto, eles têm interação célula-célula, grande taxa de proliferação com uma fase do ciclo celular G1 extremamente curto e um núcleo enorme para a taxa de citoplasma (Papp e Plath, 2011). Nas fases iniciais de reprogramação, as células de ciclo rápido agrupam-se em conjunto e sofrem mudanças que correspondem à perda de características mesenquimais e à aquisição de características das células epiteliais (Li *et al.*, 2010). Isto é exatamente o oposto da transição epitélio-mesenquimal (EMT) do desenvolvimento da pluripotência para a transição da diferenciação, durante a reprogramação (Li *et al.*, 2010; Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010). Portanto, as vias de sinalização conhecidas por promoverem a transição epitelial-mesenquimal (TEM) deveriam aumentar a eficiência da reprogramação. Consequentemente, tem sido mostrado que a inibição do TGF- β aumenta a reprogramação, porque a atividade do TGF- β previne o MET (Li *et al.*, 2010). Além disso, tem sido mostrado que a sinalização BMP melhora a reprogramação através da *up-regulation* dos microRNA pro-Met (Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010). Além disso, os contactos célula-célula mediados pela E-caderina são necessários e o seu *knockdown* interfere com a reprogramação (Chen *et al.*, 2010).

4.1.3 Eventos Tardios no sentido da Pluripotência

Os genes que estão relacionados com o carácter da célula epitelial são ativados para a pluripotência. Enquanto a fosfatase alcalina e o SSEA-1 são considerados marcadores de estágio intermédio, o Nanog, no ratinho, e o TRA-1-60, em células humanas, são marcadores de estágio final para a pluripotência (Okita *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007; Mikkelsen *et al.*, 2008; Stadtfeld *et al.*, 2008b; Chan *et al.*, 2009). Tem sido postulado que a expressão dos fatores de reprogramação iniciam sequencialmente e numa ordem bastante sincronizada. Ainda que o estado CEPi necessite continuamente da expressão dos fatores de reprogramação para ultrapassar os obstáculos para a pluripotência, a manutenção das CEPi é independente da superexpressão (Brambrink *et al.*, 2008, Stadtfeld *et al.*, 2008b; Papp e Plath, 2011; Plath e Lowry, 2011).

4.2 Mecanismos na Reprogramação

No processo da reprogramação tem sido mostrado que, para a aquisição da pluripotência, é necessária uma ampla alteração genómica dos marcadores epigenéticos, a regulação dos *checkpoints* do ciclo celular e do MET (Samavarchi-Tehrani *et al.*, 2010, Plath e Lowry, 2011). Embora os fatores de reprogramação reiniciem o fenótipo celular a partir de dentro, também necessitam de sinais extrínsecos fornecidos pelas condições de cultura das CEPi, incluindo os fatores de crescimento, as citoquinas e outros sinais fornecidos pelo meio de cultura da célula, soro fetal bovino e células alimentadoras. Não é claro como os sinais extrínsecos são integrados com os fatores de atuação intrínsecos, e esta é uma área ativa de investigação (Ralston e Rossant, 2010).

4.2.1 Fatores Genéticos

A reprogramação de células somáticas requer o uso de fatores genéticos, nomeadamente o Oct4, o Nanog, o Sox2, o Klf4, o c-Myc e o Lin28 (Takahashi e Yamanaka, 2006; Yu *et al.*, 2007). Foi mostrado anteriormente que o Nanog, o Lin28 e o c-Myc podem ser dispensáveis para a reprogramação (Yu *et al.*, 2007; Nakagawa *et al.*, 2008; Wernig *et al.*, 2008b).

Theunissen e Silva (2011) referiram que “o Nanog contraria a diferenciação, mas é, em última análise, dispensável para a manutenção da pluripotência nas CEE”. Portanto, embora o Nanog não estivesse entre os principais fatores de transcrição da reprogramação, ele é essencial para finalizar a reprogramação. Os autores propuseram que o Nanog atua como um interruptor molecular para ligar o programa pluripotente natural em células de mamíferos (Theunissen e Silva, 2011). Além disso, foi demonstrado que a superexpressão do Nanog pode acelerar a reprogramação numa predominante taxa de divisão celular, de forma independente (Silva *et al.*, 2006).

O Myc, ao contrário do Oct4, do Sox2 e do Klf4, não está envolvido, durante o último passo da reprogramação, na *upregulation* da rede de pluripotência. A explicação do porquê deste fator ser dispensável para a reprogramação é o facto de o Myc poder aumentar mas não ser absolutamente necessário para a transcrição da pluripotência dos genes alvo, sendo, no entanto, capaz de aumentar a eficiência e a cinética do processo (Nakagawa *et al.*, 2008; Wernig *et al.*, 2008b; Plath e Lowry, 2011).

Os compostos químico apropriados, em meio em cultura, podem substituir o Sox2 e o Klf4. Estes dois fatores também eram dispensáveis quando as células somáticas, que têm grande expressão de Sox2 e Klf4, são usadas para a reprogramação (Aoi *et al.*, 2008; Huangfu *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009).

O último elemento do principal circuito regulatório transcricional, o Oct4, revelou ser o fator mais importante do *cocktail* de reprogramação. Dos quatro fatores iniciais é o único que demonstrou ser essencial para a reprogramação (Walia *et al.*, 2011). No entanto, um estudo recente mostrou que o NR5A2, também conhecido com LRH-1 (receptor homólogo do fígado -1), pode substituir o Oct4, com uma melhor eficiência de reprogramação (Heng *et al.*, 2010).

É óbvio que os efeitos dos principais fatores de reprogramação são regulados e mediados por outros recetores, fatores de transcrição, fatores de crescimento, enzimas, outras proteínas e químicos (Walia *et al.*, 2011).

4.2.2 Vias de Sinalização

4.2.2.1 Sinalização Wnt

Foi demonstrado que alguns dos componentes desta via evolutiva conservada aumentam a atividade reprogramadora. Um efector *downstream* da via Wnt, um inibidor da cínase-3 da síntese do glicogénio (GSK3), chamada de 6-bromoindirubin-3'-oxime ou BIO, revelaram-se capazes de manter a pluripotência em CEE humanas e de ratinho (Sato *et al.*, 2004). A adição do Wnt3a a meios de cultura aumenta a eficiência da reprogramação (Marson *et al.*, 2008). Outro inibidor da GSK3, o CHIR99021, compensa a ausência de Sox2 na programação das hCEPi (Li *et al.*, 2009). Dando um grande crédito às via de sinalização mediadas pela ativação da transcrição da Wnt/b-catenina, Abu-Remaileh *et al.* (2010) mostrou que o Oct4 interage com a b-catenina e modula a sinalização do Wnt para manter a identidade da célula estaminal e regular a decisão do destino da célula.

4.2.2.2 Sinalização TGF-b/Activina/Nodal

Como uma das mais estudadas vias, o TGF-b/Activina/Nodal desempenha um papel importante na manutenção do estado de pluripotência. A sinalização do FGF e do TGF-b/Activina promove a autorrenovação das hESCs. O Nanog tem-se revelado como uma molécula crucial para a pluripotência e um alvo direto da via do TGF-b/Activina (Xu *et al.*, 2008). Pela ligação dos coactivadores SMAD ao promotor proximal do Nanog, a expressão do Nanog é *upregulated* (Theunissen e Silva, 2011). Enquanto que a inibição da sinalização do TGF-b, usando um recetor TGF-b/inibidor da cinase Alk5, aumenta a eficiência da reprogramação das CEPi de ratinho, este inibidor poderia substituir-se com o Sox2 e o c-Myc. No entanto, um efeito semelhante não foi visto em hCEPi (Maherali e Hochedlinger, 2009). Foi demonstrado que a inibição da sinalização TGF-b leva à transição mesenquimal em hCEPi (James *et al.*, 2005).

4.2.2.3 Sinalização BMP

As BMPs pertencem à superfamília dos TGF-b. Elas estão envolvidas na regulação da proliferação das células, na diferenciação e na apoptose e, por isso, desempenham papéis essenciais durante o desenvolvimento embrionário e na formação de padrões (Massague, 1998). Xu *et al.* (2008) mostraram que as SMAD responsivas, tanto as TGFb- como as BMP, se podem ligar com o promotor proximal do Nanog, causando um aumento no promotor de atividade do Nanog e esta atividade é diminuída pela sinalização BMP. A diferenciação das CEPi é promovida pela sinalização BMP (Xu *et al.*, 2008). Outro membro da família BMP é o fator de crescimento e diferenciação 3 ou GDF3, e tem sido demonstrado que bloqueia a sinalização BMP tanto em hESCs e mESCs (Levine e Brivanluc, 2006).

4.2.2.4 Via p53

Vários grupos referiram que o p53, um dos fatores de transcrição supressor de tumores mais bem estudados, atua como uma barreira para a reprogramação da célula somática (Kawamura *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Utikal *et al.*, 2009). Hong *et al.* (2009) propuseram que a via p53-p21 serve como uma salvaguarda não só na tumorigenicidade, mas também na geração de célula pluripotente induzida (Hong *et al.*, 2009). Por outro lado, Hanna *et al.* (2009) mostraram que a maioria das células são capazes de se tornar em CEPi sem esgotar o p53 ou imortalizar as células (Hanna *et al.*, 2009). Além disso, a monitorização do efeito *knockdown* do p53, ao nível da célula singular, mostrou que muitas das células esvaziadas de p53 descarrilam da via de reprogramação e baixam a eficiência da reprogramação global (Smith *et al.*, 2010). Tem sido sugerido que os futuros esforços para uma reprogramação com maior sucesso deve visar células alvo com menores níveis de p53 e/ou maior capacidade proliferativa, em vez de se silenciar a via p53 (Tapia e Scholer, 2010). Consequentemente, a equipa de Yamanaka já publicou um método simples e eficiente, usando a supressão do p53 e do c-Myc não transformado, para reprogramar as células somáticas humanas (Okita *et al.*, 2011).

4.3 Dinâmicas da Reprogramação Direta

No geral, a reprogramação das células somáticas pluripotentes induzidas é um processo ineficiente mesmo quando se usam estratégias diferentes. Existe uma latência de aproximadamente 5 a 10 dias antes da primeira CEPi aparecer. Este atraso e a baixa

eficiência são indicadores de que estão envolvidos mecanismos estocásticos na indução da reprogramação (Hann *et al.*, 2009). Embora a baixa eficiência seja uma forte barreira para a aplicação das CEPI humanas na medicina, a estocástica e os mecanismos epigenéticos limitantes de taxa mostram que, com o fator de reprogramação de estequiometria balanceada, quase todas as células têm a capacidade de gerar CEPI (Hanna *et al.*, 2010b).

Yamanaka (2009a, b) propôs recentemente que somente algumas células numa cultura de células primárias podem ser competentes para a reprogramação. De facto, o vetor retroviral pode infectar mais de 90% dos fibroblastos, no entanto, somente um pequeno número de colónias de CEPI emergiram com uma eficiência de 0,001%. Esta baixa eficiência sugere que a origem das CEPI pode ser emergente de um pequeno número de células do tecido. Os candidatos para estas células são as estaminais adultas ou as células progenitoras, uma vez que são raras e estão mais perto das células pluripotentes, ao nível de desenvolvimento, do que das células diferenciadas. Também se pensou que, para o sucesso da reprogramação, pode ser crucial a ativação de genes adicionais pela mutagénese insercional (Yamanaka 2009^a, b). No entanto, este modelo (chamado de modelo de elite) não podia manter-se por muito, uma vez que as CEPI humanas e de ratinhos foram geradas a partir de várias células somáticas terminalmente diferenciadas, incluindo os linfócitos B e T (Hanna *et al.*, 2008; Eminli *et al.*, 2009), assim como as células pancreáticas β (Stadtfeld *et al.* 2008a). Além disso, Okita *et al.* (2008) e Stadtfeld *et al.* (2008^a) mostraram em simultâneo que a mutagénese insercional não é um passo essencial do processo de reprogramação.

Por isso, Yamanaka sugere outra teoria no modelo estocástico. Neste modelo ele sugeriu que a maioria, se não todas, as células diferenciadas têm o potencial de se tornarem CEPI pela introdução de quatro fatores (Yamanaka, 2009a, b). Igualmente, Meissner *et al.* (2007), mostraram previamente que mesmo as colónias de CEPI semelhantes começam a expressar o Oct4 em alturas diferentes. Estes dados mostram que os eventos de reprogramação são de natureza estocástica (Meissner *et al.*, 2007). Além disso, ao invés de afirmar que o estado de diferenciação por si só pode também influenciar a suscetibilidade das células para formar CEPI (Eminli *et al.*, 2009), há também relatórios que mostram que as CEPI não preferem células menos diferenciadas e, controlar a eficiência das placas *in vitro*, a expansão de crescimento e os métodos de entrega dos genes, é fundamental para este propósito (Hanna *et al.*, 2009).

Embora o mecanismo exato ainda seja desconhecido, a reprogramação é uma sequência de eventos muitos complexos que requer o silenciamento do programa das células somáticas e depois a redefinição do programa de pluripotência. Para além dos fatores genéticos e das vias de sinalização, as modulações epigenéticas e a regulação são claramente importantes para quebrar as barreiras epigenéticas e depois atingir a autorrenovação e a pluripotência.

4.4 Modificações Epigenéticas

A epigenética descreve as modificações do ADN mitoticamente hereditárias ou da cromatina, sem alterar a sequência nucleótica. A metilação do ADN, a modificação das histonas, as variantes da histona e o ARN não-codificante são mecanismos da regulação epigenética (Bird, 2002). Uma questão central no campo da pluripotência das CEE é até que ponto os marcadores epigenéticos regulam, em vez de simplesmente refletirem, o estado pluripotente *in vitro* (Meissner, 2010). Tem sido sugerido que as CEE têm assinaturas únicas, incluindo as metiltransferases do ADN altamente expressas (Dnmt1, 2, 3a, 3b e 3 l) e as subunidades do núcleo PRC1 e 2, distribuição das CpG distintas das células somáticas e da MCI e, finalmente, diferente distribuição e enriquecimento de várias modificações das histona (Meissner, 2010). No entanto, os seus papéis reguladores individuais estão longe da nossa

compreensão intuitiva. Apesar de avanços significativos na tecnologia, ainda é difícil descrever a especificação da linhagem e a remodelação global associada à epigenética para muitos tipos de células *in vitro*. Por isso, ainda é fascinante como uma célula somática muda o seu estado epigenético para a pluripotência, ao repelir o estado epigenético existente, sem passar pelo desenvolvimento normal ou redefinir completamente todos os seus marcadores (Meissner, 2010). Tem sido sugerido que a reprogramação da célula somática envolve uma massiva reconfiguração da estrutura da cromatina, da metilação do ADN até às modificações das histonas e remodelação do nucleossoma (Ang *et al.*, 2011).

Os candidatos para as modificações epigenéticas no processo da desdiferenciação das células somáticas para CEPi são o promotor CpG da metilação do ADN e a alteração nas modificações das histonas em relação com a importância da repressão dos genes mediada pelo DGP. As abordagens genómicas alargadas mostram que o padrão H3K9me3, dentro das regiões promotoras, é diferente entre as hESCs e as hCEPI (Maherali *et al.*, 2007; Fouse *et al.*, 2008; Doi *et al.* 2009). A comparação das CEPi e das CEE revelou a conversão de marcadores da metilação das histonas monovalentes, como as H3K4me3 ou H3K27me3, para marcadores bivalentes nos genes de desenvolvimento (Bernstein *et al.*, 2006). A perda da metilação do ADN juntamente com a reativação da transcrição dos genes de pluripotência é outro passo importante na aquisição da pluripotência. Por exemplo, a inibição da metilação do ADN com o inibidor do DNMT, 5-azacytidine; a inibição da deacetilase das histonas, usando os inibidores DACH, VPA e trichostatin A, aumenta a eficiência da reprogramação. Além disso, usando o inibidor Parnate (Tranilcipromina) da desmetilase LSD1 K4 e a indução da hipometilação da histona H3K9, usando o inibidor químico da metiltransferase G9a, BIX-01294, foram bem sucedidos para aumentar a eficiência da reprogramação (Huangfu *et al.*, 2008; Mikkelsen *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2008). Além de que, é lógico pensar que a *downregulation* dos fatores epigenéticos causam a remoção das barreiras epigenéticas, prevenindo a reprogramação. Do mesmo modo, a perda do CHD1 em células somáticas de ratinhos e um regulador transcricional PRDM14 em células humanas resulta no abaixamento da eficiência da reprogramação (Chia *et al.*, 2010).

Recentemente, dois grupos mostraram que o padrão de metilação do ADN da célula original persistiu nas CEPi de ratinhos e afetou o seu potencial de diferenciação; as CEPi do sangue diferenciam-se mais facilmente para linhagens do sangue do que as CEPi derivadas de fibroblastos (Kim *et al.*, 2010; Polo *et al.*, 2010). Embora a passagem continuada das CEPi possa apagar esta memória epigenética (Polo *et al.*, 2010), a metilação residual do ADN, dentro da linhagem específica dos genes das CEPi, demonstra que redefinir este marcador é fundamental para a reprogramação (Plath e Lowry, 2011). Além disso, Lister *et al.* (2011) mostrou que a reprogramação também induz metilações aberrantes que parecem ser específicas para o estado CEPi.

4.5 Semelhanças e Diferenças Entre as CEPi e as CEE.

As características das células somáticas são: proliferação limitada, metilação dos genes de pluripotência, exibição de morfologia celular específica de tecido, inativação do cromossoma X, *checkpoint* ativo do ciclo celular G1 e expressão de marcadores específicos das células somáticas. Por outro lado, as células pluripotentes mostram forte autorrenovação, morfologia das CEE e reativação dos genes de pluripotência pela demetilação, reativação do cromossoma X em células fêmea, atividade da telomerase e, finalmente, perda do *checkpoint* G1 (Cox e Rizzino, 2010). Embora alguns estudos tenham mostrado claramente que as CEPi são muito semelhantes às CEE (Mikkelsen *et al.*, 2008; Okita *et al.*, 2008; Soldner *et al.*, 2009), uma examinação extensiva do estado da cromatina, de ambas, mostrou que há diferenças relevantes na consistência e funcionalidade (Plath e Lowry, 2011). Tem sido demonstrado

que as assinaturas de expressão do gene das CEPi programadas viralmente são distintas das CEE (Lowry *et al.*, 2008; Maherali *et al.*, 2008; Chin *et al.*, 2009; Soldner *et al.*, 2009). No entanto, as CEPi humanas geradas sem vetores virais ou inserções genômicas ainda ostentam retidas assinaturas com potencial transcricional (Marchetto *et al.*, 2010). Wang *et al.* (2010) compararam os transcriptomas dos fibroblastos, as CEPi parcialmente reprogramadas, as CEE e as CEPi usando dados *microarray*. Eles concluíram que a maioria das linhas das CEPi reprogramadas eram similares às linhas das CEE, especialmente, os transcriptomas das CEPi derivados por episomas baseados em plasmídeos não integrantes (Yu *et al.*, 2009) eram muito mais próximos dos das CEE, ao contrário das CEPi derivadas de retrovírus (Lowry *et al.*, 2008; Maherali *et al.*, 2008; Chin *et al.*, 2009; Soldner *et al.*, 2009). Além disso, a extensão da sobreposição implementada na plataforma *microarray* foi determinada ao mostrar que as CEE e as CEPi expressam 2390 genes comuns, com somente 249 e 684 expressos exclusivamente nessas células, respectivamente. No geral, as CEPi partilham mais genes comuns com os fibroblastos dos quais elas foram derivadas (Wang *et al.*, 2010).

Dado que é esperado que o processo de reprogramação remova quaisquer alterações epigenéticas associadas com as células originadas pela transferência nuclear (NT) e CEE, que reportaram fielmente ter apagado quaisquer marcas epigenéticas presentes nas células dadoras (Okita *et al.*, 2007; Maherali *et al.*, 2008; Mikkelsen *et al.*, 2008), os dados que mostram que as CEPi partilham mais genes comuns com os seus fibroblastos parentais foram uma grande surpresa. De facto, a 19 de julho de 2010, foram publicados em simultâneo dois trabalhos que provam que as CEPi podiam reter marcas epigenéticas, que são características da célula dadora, mesmo com uma passagem precoce rigorosamente selecionada (Kim *et al.*, 2010; Polo *et al.*, 2010). O Plath e o Lowry (2011) afirmaram que a memória epigenética pode ser uma forma de reprogramação incompleta.

Além disso, Urbach *et al.* compararam linhas de hESCs isoladas de um embrião afetado com o síndrome X frágil e fibroblastos reprogramados de indivíduos afetados. Eles observaram que o gene *FMRI* permanece silenciado nas CEPi. Enquanto essas CEPi mostraram um critério de pluripotência rigoroso, o locus *FMRI* era obviamente resistente à reprogramação (Urbach *et al.*, 2010). Este estudo mostra que as CEE e as CEPi humanas não são idênticas, mesmo em algumas circunstâncias as CEE podem refletir mais fielmente o processo da doença (Unternaehrer e Daley, 2011). Além disso, Bock *et al.* (2011) usaram a quantificação da similaridade molecular através de um “cartão de pontuação”, que incluía a metilação do ADN, o transcriptoma e estudos de diferenciação, e reportou que embora as CEE exibam uma significativa variabilidade através de linhas individuais, as CEPi variam mais a um nível molecular do que as CEE (Lister *et al.*, 2011). Plath e Lowry (2011) interpretaram estas diferenças da seguinte forma:

Estas diferenças de metilação entre as CEE e as CEPi estão associadas com diferenças a um nível transcricional, que pode ser encontrado após muitas passagens e pode afetar o comportamento de diferenciação das células.

A utilização das abordagens genéticas, tanto a *forward* como a *reverse*, com ajuda das CEPi, oferece perspectivas entusiasmantes para a dissecação dos mecanismos moleculares de compromisso e de diferenciação numa linhagem celular, e irá permitir ajudar a perceber a religação das redes reguladoras que estão ativas nas células somáticas e pluripotentes (Hemberger *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2009; Saha e Jaenisch, 2009). O trabalho futuro deveria centrar-se na descoberta de quando e como as linhagens genéticas específicas e as marcas epigenéticas surgem.

Referências bibliográficas

- Abu-Remaileh M et al (2010) Oct-3/4 regulates stem cell identity and cell fate decisions by modulating Wnt/beta-catenin signalling. *EMBO J* 29(19):3236-3248
- Ang YS et al (2011) Stem cells and reprogramming: breaking the epigenetic barrier? *Trends Pharmacol Sci* 32(7):391-401
- Aoi T et al (2008) Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321(5889):699-702
- Bernstein BE et al (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125(2):315-326
- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16(1):6-21
- Bock C et al (2011) Reference maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* 144(3):439-452
- Brambrink T et al (2008) Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2(2):151-159
- Chan EM et al (2009) Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotechnol* 27(11): 1033-1037
- Chen T et al (2010) E-cadherin-mediated cell-cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells* 28(8):1315-1325
- Chia N et al. (2010) A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity. *Nature* 468(7321):316-320
- Chin MH et al (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5(1):111-123
- Cox JL, Rizzino A (2010) Induced pluripotent stem cells: what lies beyond the paradigm shift. *Exp Biol Med (Maywood)* 235(2):148- 158
- Doi A et al (2009) Differential methylation of tissue- and cancer- specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* 41(12):1350-1353
- Eminli S et al (2009) Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 41(9):968-976
- Fouse SD et al (2008) Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/Nanog, PcG complex, and histone H3 K4/K27 trimethylation. *Cell Stem Cell* 2(2):160-169
- Hanna et al (2008) Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133(2):250-284
- Hanna et al (2009) Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 462(7273):595-601
- Hanna JH et al (2010) Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143(4):508-525
- Hemberger M et al (2009) Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(8):526-537
- Heng JC et al (2010) The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell* 6(2):167-174
- Hong H et al (2009) Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 460(7259):1132-1135
- Huang S (2009) Reprogramming cell fates: reconciling rarity with robustness. *Bioessays* 31(5):546-560
- Huangfu D et al (2008) Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26(11):1269-1275
- James D et al (2005) TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 132(6):1273-1282
- Jopling C et al (2011) Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(2):79-89
- Kawamura T et al (2009) Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460(7259): 1140-1144
- Kim K et al (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*

467(7313):285-290

Levine AJ, Brivanlou AH (2006) GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos. *Development* 133(2):209-216

Li W et al (2009) Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 4(1):16-19

Li R et al (2010) A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 7(1):51-63

Lister R et al (2011) Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471(7336):68-73

Lowry WE et al (2008) Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(8):2883-2888

Maherali N et al (2007) Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1(1):55-70

Maherali N, Hochedlinger K (2009) Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol* 19(20):1718-1723

Maherali N et al (2008) A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3(3):340-345

Marchetto MC et al (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143(4):527-539

Marion RM et al (2009) A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460(7259):1149-1153

Marson A et al (2008) Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 3(2):132-135

Massague J (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753-791

Meissner A et al (2007) Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 25(10):1177-1181

Meissner A (2010) Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat Biotechnol* 28(10):1079-1088

Mikkelsen TS et al (2008) Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454(7200):49-55

Nakagawa M et al (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26(1):101-106

Okita K et al (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448(7151):313-317

Okita K et al (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322(5903):949-953

Okita K et al (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8(5):409-412

Papp B, Plath K (2011) Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell Res* 21(3):486-501

Plath K, Lowry WE (2011) Progress in understanding reprogramming to the induced pluripotent state. *Nat Rev Genet* 12(4):253-265

Polo JM et al (2010) Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 28(8):848-855

Ralston A, Rossant J (2010) The genetics of induced pluripotency. *Reproduction* 139(1):15-44

Saha K, Jaenisch R (2009) Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell* 5(6):584-595

Samavarchi-Tehrani P et al (2010) Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 7(1):64-77

Sato N et al (2004) Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10(1):55-63

Shi Y et al (2008) A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2(6):525-528

Silva J et al (2006) Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature*

441(7096):997-1001

Smith ZD et al (2010) Dynamic single-cell imaging of direct reprogramming reveals an early specifying event. *Nat Biotechnol* 28(5):521-526

Soldner F et al (2009) Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136(5):964-977

Stadtfeld M et al (2008a) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322(5903):945-949

Stadtfeld M et al (2008b) Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2(3):230-240

Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast culture by defined factors. *Cell* 126(4):663-676

Tapia N, Scholer HR (2010) p53 connects tumorigenesis and reprogramming to pluripotency. *J Exp Med* 207(10):2045-2048

Theunissen TW, Silva JC (2011) Switching on pluripotency: a perspective on the biological requirement of Nanog. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2222-2229

Unternaehrer JJ, Daley GQ (2011) Induced pluripotent stem cells for modelling human diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2274-2285

Urbach A et al (2010) Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6(5):407-411

Utikal J et al (2009) Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci* 122(Pt 19):3502-3510

Walia B et al (2011) Induced pluripotent stem cells: fundamentals and applications of the reprogramming process and its ramifications on regenerative medicine. *Stem Cell Rev Jun* 14. [Epub ahead of print]

Wang Yet al (2010) A transcriptional roadmap to the induction of pluripotency in somatic cells. *Stem Cell Rev* 6(2):282-296

Wernig M et al (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448(7151):318-324

Wernig M et al (2008) A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol* 26(8):916-924

Wernig M et al (2008.) c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2(1):10-12

Xu RH et al (2008) NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. *Cell Stem Cell* 3(2):196-206

Yamanaka S (2009a) Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 460(7251):49-52

Yamanaka S (2009b) A fresh look at iPS cells. *Cell* 137(1):13-17

Yu J et al (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318(5858):1917-1920

Yu J et al (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324(5928):797-801

Capítulo 5

Modelar Doenças num Prato

No início, a ideia principal para as abordagens terapêuticas das CEPi era o facto de que as CEPi específicas de um paciente fornecem informações importantes para as doenças humanas hereditárias, porque as células estaminais pluripotentes são capazes de se diferenciarem na maioria, se não mesmo em todos os tipos de células. Esta ideia baseava-se profundamente nos estudos da diferenciação direta de subtipos e em CEE definidas geneticamente a partir de modelos animais (Gearhart, 1998). Além disso, o ramo da biologia das CEE humanas tem vindo a prosseguir a geração de linhas de CEE humanas, como modelos de doenças, desde que Thomson *et al.* (1998) derivaram, em 1998, linhas de CEE humanas. Com os conhecidos *loci* genéticos associados a doenças e com o fenótipo explícito das doenças, as CEE humanas geneticamente modificadas poderiam ajudar nas terapias de substituição de células e na modelação de doenças humanas (Saha e Jaenisch, 2009).

No entanto, o uso de CEE humanas tem várias limitações, não só devido às preocupações políticas, religiosas, éticas e morais sobre a destruição de embriões, como também devido aos métodos ineficientes para gerar CEE humanas modificadas geneticamente. Por exemplo, a geração de CEE humanas, por via de embriões do DGP, só está disponível para um número limitado de doenças e a falta de técnicas próprias ainda é desafiante. Além disso, somente algumas doenças monogénicas podem ser detetadas por via do DGP e não há consistência entre a severidade e os sintomas clínicos dessas doenças de paciente para paciente, devido à penetração variável (Colman e Dressen, 2009). As outras alternativas, como a geração de células estaminais pluripotentes individuais por via da NT, a fusão celular com CEE e o tratamento com extratos de células pluripotentes são, por muitos motivos, muito restritivas e são poucas as doenças que foram capturadas por estes meios (Wakayama *et al.*, 2001; Taranger *et al.*, 2005).

Há décadas que têm sido usados modelos animais para doenças humanas, no entanto, eles também têm algumas limitações, como não mostrar nenhuma ou só algumas semelhanças aproximadas com a doença humana, diferenças na fisiologia e anatomia entre animais e humanos, nenhum espelhamento para defeitos cognitivos ou comportamentais das doenças neurológicas e diferente *background* genético, animal e humano, em termos do fenótipo resultante de mutações associadas e doenças (Colman e Dreesen, 2009; Saha e Jaenisch, 2009).

Para ultrapassar estes inconvenientes, as CEPi oferecem células específicas da doença e do paciente, com o conhecimento da história clínica do dador e podem ser feitas com células tiradas de todas as idades, mesmo de pacientes mais velhos com doenças crónicas (Dimos *et al.*, 2008). Podemos sumariar as vantagens de se usar em modelações de doenças humanas:

1. Fonte inesgotável de células para experimentação.
2. Capacidade de autorrenovação ilimitada com natureza pluripotente.

3. Desenvolvimento de linhas de células isogênicas.
4. Tratamentos personalizados (Mattis e Svendsen, 2011; Unternaehrer e Daley, 2011; Zhu *et al.*, 2011).

Embora ainda existam muitos desafios em relação à sua identidade, até ao momento estão disponíveis alguns relatórios para uma visão geral do fenótipo da doença *in vitro* (Ebert *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Raya *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2009b). Uma vez que as linhas de hESCs mostram resultados variáveis para se diferenciar em linhagens específicas (Osafune *et al.*, 2008), múltiplas linhas de CEPi, geradas de um só paciente, são extremamente favoráveis por terem um *background* genético idêntico.

5.1 CEPi de Específica Doença

As CEPi específicas de doença foram geradas a partir de indivíduos com distúrbios como as doenças neurodegenerativas, incluindo as ELA (Dimos *et al.*, 2008), Doenças de Parkinson (Park *et al.*, 2008^a; Baek *et al.*, 2009; Soldner *et al.*, 2009; Hargus *et al.*, 2010; Swistowski *et al.*, 2010), AME (Ebert *et al.*, 2009); síndrome de Riler-Day (Lee *et al.*, 2009) e doenças hereditárias, incluindo a doença de imunodeficiência combinada grave com deficiência da adenosina-desaminase (ADA-SCID), Síndrome de Shwachman-Diamond (SBDS), Doença de Gaucher de tipo III (DG), Distrofia Muscular de Duchenne/Becker (DMD/BMD), doença de Huntington, diabetes Mellitus tipo I ou juvenil (DM1), síndrome de Down (SD)/trissomia 21, portadores do síndrome de Lesch-Nyhan (Park *et al.*, 2008b) e anemia de Fanconi (Raya *et al.*, 2009). Existe até ao momento e como reportado por Unternaehrer e Daley (2011), as linhagens de CEPi de doenças específicas de neurologia, hematologia, cardiovascular e outras categorias (Tabela 5.1).

5.2 Escolher a Fonte das Células

De maneira a gerar as CEPi específicas do paciente, o primeiro passo será a derivação de CEPi a partir das células somáticas do paciente. As CEPi podem ser feitas com células obtidas de pacientes de todas as idades e com historial médico completo e de mais de 5.000 doenças genéticas conhecidas, sejam simples ou complexas (Cloman e Dressen, 2009). Existe tecido humano disponível, sem qualquer preocupação ética ou cirúrgica, como a gordura, o sangue, espécimes de biopsias, pele, cabelo e dentes extraídos (Aasen *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009b; Yan *et al.*, 2010). Até agora, em humanos, têm sido usados para a reprogramação os fibroblastos da pele e células mesenquimais da medula óssea (Takahashi *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Huangfu *et al.*, 2008), os queratinócitos (Aasen *et al.*, 2008; Maherali *et al.*, 2008), as células do sangue periférico (Ye *et al.*, 2009b; Loh *et al.*, 2010), os melanócitos (Utikal *et al.*, 2009), as células estaminais neurais (Kim *et al.*, 2009), as células derivadas do líquido amniótico (Li *et al.*, 2009), as células estaminais do tecido adiposo lipoaspirado (Sun *et al.*, 2009), as células estaminais dentárias (Tamaoki *et al.*, 2010; Yan *et al.*, 2010) e as células estaminais mesenquimais da matriz do cordão umbilical e da membrana amniótica (Cai *et al.*, 2010). Além disso, os bancos de tecidos congelados, e as linhas celulares também podem ser usadas, embora estes providenciem muito pouca informação clínica sobre o dador (Colman e Dreesen, 2009).

Uma vez que a maioria dos fenótipos de doenças só são observados em células diferenciadas, somente a geração de CEPi pode providenciar uma fonte para a pluripotência. As doenças monogênicas são os alvos mais frutíferos, porque o gene e, muitas vezes, o seu produto são conhecidos. Estender este paradigma experimental tanto a doenças desconhecidas ou mais complexas, a fenótipos multifatoriais ou doenças e modelar doenças

Tabela 5.1 (continuação)

Doença	Referência	Defeito Molecular	Célula dadora	Idade e Sexo do dador	Método	Diferenciou-se em	Doença Fenocopiada para	Doença Fenocopiada em células diferenciadas	Drogas ou testes funcionais
Desautonomia familiar	Lee et al., 2009)	Salto parcial do exão 20 do <i>IKBKAP</i> , proteína IKAP reduzida	Fibroblasto dérmico	10 F	LV4	SN central, SC periférico, hematopoiética, endotelial, endodermal	Maior rácio normal: transições mutantes em iPS que em fibroblastos	Sim; diminuição da expressão dos genes envolvidos na diferenciação da neurogenése e neuronal	Diminuição da migração na análise da cicatrização de feridas; redução da forma de união da queratina mutante e aumento da percentagem de neurónios diferenciados; nenhuma melhoria na migração
Síndrome de Rett	(Hotta at al., 2009; Marchetto et al., 2010)	Mutação heterozigótica no <i>MECP2</i> : C916T, 115de132, C730T, C473T	Fibroblasto	3,5,8 F	LV4 EOS, RV4	Nenhuma, células progenitoras neurais n	n.d., não	n.d., sim: reduzido número de espinhas e densidade da formação sinapse glutamatérgica; diminuição da frequência/densidade das correntes espontâneas	
<i>Hematológicas</i>									
ADA-SCID	(Park <i>et al.</i> , 2008a)	GGG, AGG, exão 7 e exão 10 Del(GAAGA), gene <i>ADA</i>	Fibroblasto	3 M	RV4	Nenhuma	n.a.	n.d.	Não
Anemia de Fanconi	(Raya et al., 2009)	FA-A, FA-D2 corrigida	Fibroblasto dérmico	Desconhecida M	RVA, 2 rondas com 2i	Hematopoiético	Não (corrigida)	Não (corrigida)	Não

(continua)

Tabela 5.1 (continuação)

Síndrome de Shwachman-Diamond	(Park et al., 2008a)	Multifactorial	Células estaminais mesenquimais	4 M	RV4	Nenhuma	n.a.	n.d.	Não
Anemia das células falciformes	(Mali et al., 2008; Somers et al., 2010)	Indefinido? SS	Fibroblasto	20 semanas fetais F	1eLV4; eLV4 + T	Nenhuma	n.d.	n.d.	Não
Beta talassémia	(Ye at al., 2009b)	Homozigótico para a deleção do codão 41/42 4-bp (CTTT) na beta-globina	Fibroblasto dérmico	Desconhecido	RV4	Hematopoiético	n.a.	n.d.	Não
Policitemia vera	(Ye at al., 2009b)	JAK2 1849G. T Heterozigótico	Fibroblasto	Desconhecido	RV4	Hematopoiético	n.a.	Sim; eritropoiese aumentada	Não
Mielofibrose primária	(Ye at al., 2009b)	JAK2 1849G. T Heterozigótico	Fibroblasto	Desconhecido	RV4	Nenhuma	n.d.	n.d.	Não
Metabólicas									
Doença de Lesch-Nyhan (Portador)	(Park et al., 2008a; Soldner et al., 2009; Khan et al., 2010)	Heterozigosidade do HPRT1; mutação A. G no exão 3 do HPRT1	Fibroblasto	34, 11 F	ILV4 + N, iLV3; AAV	Nenhuma	n.a.	n.d.	Não
Diabetes tipo I	(Park et al., 2008a; Maehr et al., 2009)	Multifactorial, desconhecido	Fibroblasto	42, 32, 30 F,M	RV3, 4	Celulas semelhantes a beta:	n.a.	n.d.	Não
Doença de Gaucher tipo III	(Park et al., 2008a)	AAC > AGC, exão 9, inserção de G, nucleótido 84 do cADN, gene GBA	Fibroblasto	20 M	RV4	Nenhuma	n.a.	n.d.	Não

(Continua)

Tabela 5.1 (continuação)

AAT	(Rashid et al., 2010; Somers et al., 2010)	Deficiência de Alfa-1 Antripsina: G342 K	Fibroblasto dérmico ou hepático	65, 55, 47, 57, 61, 64, 0.3 anos F,M	RV4, 1eLV4	Células semelhantes a Hepatócitos (Fetal)	n.d.	Sim; acumulação de polímeros	Não
GSD1a	(Ghodsizadeh et al., 2010; Rashid et al., 2010)	Glicose hepática-6-deficiência da fosfatase	Fibroblasto dérmico	25, 7 M	RV4	Células semelhantes a Hepatócitos (Fetal)	n.d.	Sim; hiperacumulação de glicogénio	Não
FH	(Rashid et al., 2010)	Hipercolesterolemia familiar, mutação autossômica dominante no LDLR	Fibroblasto	Desconhecido	RV4	Células semelhantes a Hepatócitos (Fetal)	n.d.	Incorporação do LDL degradado	Não
Síndrome de Crigler-Najjar	(Ghodsizadeh et al., 2010; Rashid et al., 2010)	Deleção de 13 bp, exão 2 do <i>UGT1A1</i> ; ou L413P	Fibroblasto dérmico	2 meses, 19, 21 anos M,F	RV4	Células semelhantes a Hepatócitos (Fetal)	n.d.	n.d.	Não
Tirosinemia hereditária do tipo 1	(Ghodsizadeh et al., 2010; Rashid et al., 2010)	533T > G V166G na fumarilacetoacetato hidrolase	Fibroblasto dérmico	2 meses, 6 anos M,F	RV4	Células semelhantes a Hepatócitos (Fetal)	n.d.	n.d.	Não
Colestase intra-hepática familiar progressiva	(Ghodsizadeh et al., 2010)	Multifactorial	Fibroblasto dérmico	17 F	RV4	Células semelhantes a Hepatócitos (Fetal)	n.d.	n.d.	Não
Síndrome de Hurler (MPS-IH)	Tolar et al., 2011)	Deficiência de IDUA; Y167X, W402X; W402X, W402X	Queratinócito, MStrC	1 M	RV4	Hematopoiético	Sim; Maior acumulação de GAG	Sem diferença no CD34 ou CD45 + células ou formação de colónias	Não
<i>Cardiovasculares</i>									
Síndrome de LEOPARD	(Carvajal-Vergara et al., 2010)	T468 M heterozigótico no <i>PTPN11</i>	Fibroblasto	25, 34 F,M	RV4	Cardiomiócitos	n.d.	Sim; hipertrofia cardiomiopática	
Síndrome QT-longo	(Moretti et al., 2010)	R190Q dominante no <i>KCNQ1</i>	Fibroblasto dérmico	8, 42 M	RV4	Cardiomiócitos	n.a.	Sim; QT longo em miocitos ventriculares e arteriais; membrana celular deficiente, alvo da proteína <i>KCNQ1</i> .	Redução da densidade da correntes Iks

(Continua)

Tabela 5.1 (continuação)

Outras categorias									
Distrofia Muscular de Duchenne	(Park et al., 2008a; Tchieu et al., 2010)	Deleção do exão 45-52 ou 46-50, gene da distrofina	Fibroblasto dérmico	47, 13, 6 F portador, M afetado	RV4, 1LV4	Nenhuma	n.a.	n.d.	Não
Distrofia Muscular de Becker	(Park et al., 2008a)	Mutação na identificada na distrofina	Fibroblasto	38 M	RV4	Nenhuma	n.a.	n.d.	Não
Disceratose congénita (DC)	(Soldner et al., 2009; Agarwal et al., 2010)	del37L no DKC1	Fibroblasto	7, 30 M	RV4, iLV3	Nenhuma	Não	n.d.	Não
Fibrose Quística	(Somers et al., 2010; Warren et al., 2010)	Delta F508 homozigótico no CFTR	Fibroblasto dérmico	8, 21, 29, 31, 33 F,M	1eLV4	Nenhuma	n.d.	n.d.	Não
Esclerodermia	(Somers et al., 2010)	Desconhecido	Fibroblasto dérmico	47 F	1eLV4	Nenhuma	n.d.	n.d.	Não
Osteogenesis Imperfecta	(Khan et al., 2010)	G > A no exão 34 do COLIA2	CEM	Desconhecido	AAV OSLN	Nenhuma	n.a.	n.d.	Não

prolongadas, como a doença de Alzheimer e a de Parkinson, seria desafiante (Colman e Dreesen, 2009). Para as doenças que exibem um início tardio em seres humanos, a cinética da patologia da doença poderia ser estimulada num prato de cultura celular, ao expor as células a um stress experimental *in vitro* (ex. inanição de soro, redução do O₂, choques térmicos, etc.) (Saha e Jaenisch, 2009). Por outro lado, Colman e Dreesen (2009), enfatizaram que o termo “início tardio” não reflete os desenvolvimentos subclínicos que possam ocorrer muito mais cedo e que possam ser capturados pela metodologia *in vitro*.

Em conjunto, é óbvio que o padrão da doença nos guiará a alternativas para a célula tipo do dador. Uma vez que a detecção de mutações para as doenças como a AME pode ser possível em todas as células do paciente, as biopsias da pele podem ser usadas como células dadoras facilmente acessíveis. Por outro lado, o genótipo heterozigótico da maioria das desordens hematopoiéticas só poderia ser detetado em progenitores particulares. Por isso, esses progenitores deviam ser escolhidos como fontes de células para reprogramação (Ebert *et al.*, 2009; Saha e Jaenisch, 2009; Ye *et al.*, 2009b).

Além disso, relatórios recentes sobre a impressão epigenética persistente nas CEPi (Kim *et al.*, 2010; Polo *et al.*, 2010) poderiam ser uma oportunidade útil para as pesquisas sobre as doenças esporádicas e multifatoriais. Embora essas impressões persistentes se manifestem como expressão diferencial do gene e alterem a capacidade de diferenciação, elas podem ser usadas em aplicações terapêuticas potenciais, para aumentarem a diferenciação nas linhagens de células desejadas (Kim *et al.*, 2010; Polo *et al.*, 2010). Uma memória epigenética persistente seria vantajosa, especialmente para as doenças que têm um *background* de combinações genéticas e de fatores ambientais. Nessas doenças, qualquer alteração epigenética seria estudada por via das CEPi carregando uma impressão parental. As células derivadas de pacientes que sofrem da mesma doença, mas que vivem em regiões geográficas diferentes, poderiam dar-nos pistas importantes sobre os fatores ambientais, como os metais tóxicos e pesticidas, estilos de vida e hábitos de dieta que podem afetar o epigenoma e refletir fatores de riscos (Jaenisch e Bird, 2003). Por último, para as doenças autónomas não celulares, o possível sucesso com um tipo de célula pode afetar o outro mediador patológico (Colman e Dreesen, 2009).

5.3 Identificação de Colónias de CEPi

Há vários métodos ou técnicas para selecionar ou distinguir clones reprogramados com sucesso, a partir de colónias parcialmente reprogramadas ou simplesmente transformadas (Stadtfeld e Hochedlinger, 2010).

1. A reativação da pluripotência endógena associada a genes ligados a cassetes de seleção de drogas. O Fbxo15, o Nanog ou o Oct4 e o Klf4 (Takahashi e Yamanaka, 2006; Maherali *et al.*, 2007; Okita *et al.*, 2007; Wernig *et al.*, 2007; Pfannkuche *et al.*, 2009),
2. Sistemas de vetores lentivirais carregando fragmentos promotores de genes de pluripotência (Hotta *et al.*, 2009),
3. Para as CEPi humanas, a expressão TRA-1-81 (Lowry *et al.*, 2008),
4. “Indicador de retrovírus” que expressam proteínas fluorescentes, que se tornam silenciados aquando da aquisição de pluripotência (Chan *et al.*, 2009),
5. Usando somente critérios morfológicos (Blelloch *et al.*, 2007; Maherali *et al.*, 2007; Meissner *et al.*, 2007),
6. A combinação da seleção morfológica e de vetores indutores da doxíciclina (Stadtfeld *et al.*, 2008),
7. Para as CEPi de ratinho, o gene de expressão GH2 (Liu *et al.*, 2010; Stadtfeld *et al.*, 2010),

8. O gene MEG-3 como homólogo humano do GH2, para identificar as CEPi humanas (Stadtfield e Hochedlinger, 2010).

A geração de CEPi específicas de paciente/doença segue métodos *standard*. Em resumo, as células alvo são infetadas com sistemas de reprogramação carregando fatores reprogramadores. Após vários dias, as células infetadas são tripsinizadas e transferidas para pratos com uma camada de células alimentadoras e, no dia seguinte, o meio é substituído por um meio de CEE humanas *standard* e mudado diariamente a partir daí. Quando aparecem, as colónias semelhantes às CEE humanas são escolhidas mecanicamente ou selecionadas pelos sistemas ou métodos descritos anteriormente. Depois, a pluripotência é avaliada de acordo com a similaridade das putativas para as CEE (Fig. 5.1). Para se confirmar uma correta e completa reprogramação deve-se confirmar a atividade do perfil do ciclo celular, a manutenção normal do cariótipo, a atividade da fosfatase alcalina e a expressão de vários antígenos associados às CEE (SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-81, Nanog, etc.), a *downregulation* ou falta de imunoreactividade contra fatores parentais específicos da célula (como o antígeno TE-7, associado ao fibroblasto), a expressão de genes de pluripotência (Rex1/Zfp42, Foxd3, Tert, Nanog e Cripto/Tdgf1). A transcrição reversa da PCR e a imunocitoquímica podem ser usadas para avaliar genes específicos ou proteínas, enquanto que, pode ser útil um exame mais aprofundado da expressão global com uma análise *microarray* de genes (Yoshida e Yamanaka, 2010).

Geralmente os corpos embrioides (EB) são criados como um primeiro passo, agregando ou colocando amontoados numa suspensão de cultura, para a avaliação da diferenciação *in vitro*. As EB resultantes são colocadas em pratos de plástico revestidos com gelatina e deixadas a anexarem-se para que a cultura se desenvolva. Depois disso, as linhas de CEPi irão diferenciar-se espontaneamente nos tipos de células representativos das três camadas germinativas embrionárias (Maherali *et al.*, 2008).

Para determinar a pluripotência *in vivo*, as CEPi devem ser injetadas em ratinhos NOD-SCID imunocomprometidos para ensaio do teratoma. As análises histológicas dos teratomas resultantes devem mostrar células representativas das três camadas germinativas, incluindo, por exemplo, para a diferenciação ectodérmica: células pigmentadas; para a diferenciação endodérmica: pulmão, respiratório e epitélio semelhante aos intestinos; e para a diferenciação mesodérmica: mesênquima, tecido adiposo e cartilagem. As análises imunocitoquímicas podem ser usadas para detetar a expressão da α -actina do músculo liso (α -SMA), a desmina, a vimentina, etc. para a mesoderme; a α -fetoproteína (AFP) para a endoderme; a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) e a tubulina β III para os marcadores da ectoderme (Carvajal-Vergara *et al.*, 2010).

O critério mais rigoroso para as mESCs/CEPi é a sua habilidade de gerarem linhas germinativas de quimeras de ratinho adulto e, por conseguinte, a transmissão da linha germinativa. Para as CEPi humanas e por ora, a formação de teratoma em ratinhos imunodeficientes parece ser aceitável (Daley *et al.*, 2009; Yoshida e Yamanaka, 2010). Além disso, a rigorosidade do critério proposto para as mCEPI pode não ser totalmente requerido para as aplicações em que as linhas de células humanas são usadas para modelarem o processo da doença *in vitro*, e para a triagem de novos medicamentos e toxicidade dos medicamentos (Ebert *et al.*, 2009). por outro lado, uma vez que

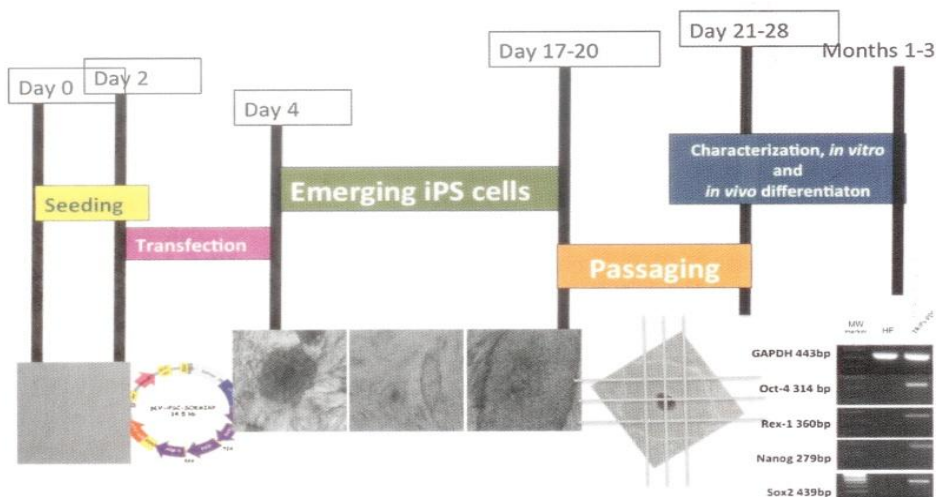


Fig. 5.1 Processo de reprogramação em células da polpa dentária.

os correntes ensaios de teratomas são de natureza qualitativa, uma avaliação quantitativa completa da capacidade de diferenciação das linhas de células geradas, poderia rapidamente permitir saber se essas linhas mantêm a capacidade para a diferenciação nas três camadas germinativas ou se têm uma capacidade de diferenciação restringida, mesmo com as linhas que falham o nível funcional da formação de teratoma. Um grupo de investigadores sustenta que as CEPi mais desejadas, para serem usadas em transplantes, podem ser aquelas que não formam teratoma *in vivo*, mas que mantêm a capacidade de se diferenciarem *in vitro* nos tipos de células desejadas. Eles propõem que esta possibilidade só pode ser determinada se as linhas de CEPi, não formadoras de teratoma, forem completamente estudadas *in vitro* (Ellis *et al.*, 2009). Em conclusão, para o propósito tanto da medicina regenerativa, como da modelação de doenças, as células não precisam de ser da linha germinal ou teratoma competentes, desde que tenham a capacidade de se autorrenovarem e diferenciarem nas células alvo desejadas (Yamanaka, 2009a, b).

Não ficou claro se reprogramar uma célula humana feminina reativa o cromossoma X inativado, como no ratinho. Foi recentemente mostrado que as CEPi humanas, derivadas de vários fibroblastos femininos, carregam um cromossoma X inativo, em contraste com as CEPi de ratinho que carregam dois cromossomas X ativos. Embora esse dados indiquem que a reversão do cromossoma X inativo não seja necessário para a programação de células humanas, deve-se ter em consideração as implicações que a inativação do cromossoma X tem para a utilização das CEPi femininas com doenças genéticas devastadoras ligadas ao cromossoma X, como o síndrome do X frágil (mutação no FMR1), a α -Talassémia (ATRX), o síndrome de Rett (MECP2), o síndrome de Coffin-Lowry (RSK2), a distrofia muscular de Duchenne, o síndrome Lesch-Nyhan (HPRT) e o síndrome de Wiskott-Aldrich (WASP) (Tchieu *et al.*, 2010).

5.4 Caraterização da Mutação Genética

A geração de CEPi de pacientes com uma variedade de doenças genéticas oferece uma oportunidade para recapitular tanto a formação de tecidos humanos normais e patológicos *in vitro*, ao mesmo tempo que fornece uma boa ferramenta para as investigações de doenças patológicas. Devem ser feitas análises de mutações moleculares, como a análise do cariótipo e a análise da impressão digital, se as células forem tiradas de pacientes com as clássicas

doenças mendelianas hereditárias e com mutações pontuais em genes conhecidos e essenciais para uma dada função (Park *et al.*, 2008b).

Para verificar se as linhas de CEPi, específicas do paciente, correspondem à do dador das células, deve ser feita a análise da impressão digital do ADN das linhas de CEPi e das células do dador das quais elas foram derivadas. Adicionalmente, deve ser usado o sequenciamento direto e o polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição, específicos do alelo, para comparar o genótipo das linhas das CEPi com as das células hospedeiras doadas. Além disso, a análise da reação em cadeia da polimerase (PCR), do ADN genómico das linhas da CEPi, irá revelar se elas carregam cópias dos transgenes dos quais foram transduzidos (Dimos *et al.*, 2008).

5.5 Diferenciação das CEPi nos Tipos de Célula Desejados

Começando com as decisões da primeira linhagem de células, a expressão do gene e as interações mútuas entre fatores de transcrição determinadores de linhagem com funções antagonizadoras, mostram estocasticidade (Hemberger *et al.*, 2009). O papel orquestrador da rede reguladora do gene aponta padrões biológicos para a diferenciação. Até à data, os estudos das CEE focaram-se maioritariamente na derivação de subconjuntos de populações de células de tecidos específicos. Assim, a diferenciação específica de linhagem de CEE de murinos e humanos revelou ser uma poderosa ferramenta para se estudar os eventos embrionários iniciais e a restrição de linhagem para gerar um fornecimento ilimitado de células para terapias e engenharia de tecidos. Para produzir tanto células progenitoras como células mais maduras, foram aplicados vários fatores exógenos numa sequência e ao longo do tempo, o que é altamente remanescente do desenvolvimento normal.

Muita da esperança investida nas células estaminais específicas do paciente é baseada na suposição de que será possível diferenciá-las em tipos de células relevantes para doenças. Para se diferenciar os tipos de células desejados, dentro da população mista das CEE em diferenciação, há vários protocolos de diferenciação de células estaminais a imitar o correto cronograma da organogénese humana normal. Foram usados muitos e bem estabelecidos protocolos para as diferenciações hematopoiética, endotelial, osteoblástica, osteoclástica (Tsuneto *et al.*, 2003; Kawaguchi *et al.*, 2005; Grigoriades *et al.*, 2010), cardíaca (Doetschman *et al.*, 1985; Schenke-Layland *et al.*, 2008; Arbel *et al.*, 2010), compromisso neural (Ying e Smith, 2003), pancreática (Banerjee *et al.*, 2011), hepática (Gerbal-Chaloin *et al.*, 2010), adipogénica e condrogénica (Wdziekonski *et al.*, 2003). Além disso, o destino da especificação da célula e a maturação podem ser seletivamente alteradas, por via da manipulação das vias de sinalização do desenvolvimento endógeno (Rathjen e Rathjen 2003; Meyer *et al.*, 2009). A capacidade de diferenciar eficientemente e reprodutivamente as CEPi *in vitro* para linhagens específicas foi conseguido usando os protocolos descritos, com algumas modificações (Dimos *et al.*, 2008; Narazaki *et al.*, 2008; Tateishi *et al.*, 2008; Wernig *et al.*, 2008a; Ebert *et al.*, 2009; Hu e Zhang 2009; Jin *et al.*, 2009; Karumbayaram *et al.*, 2009; Pfannkuche *et al.*, 2009; Senju *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009; Taura *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Carvajal-Vergara *et al.*, 2010; Comyn *et al.*, 2010; Dick *et al.*, 2010; Gamm e Meyer 2010; Huang *et al.* 2010; Kaichi *et al.*, 2010; Lamba *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010; Martinez-Fernandez *et al.*, 2010; Parameswaran *et al.*, 2010; Swistowski *et al.*, 2010; Teramura *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2010).

Há muitos exemplos típicos, em publicações recentes, para a diferenciação direta das CEPi para os tipos de células influenciados pela doença (Tateishi *et al.*, 2008; Meyer *et al.*, 2009; Grigoriadis *et al.*, 2010). Nesses estudos os investigadores mostraram que era possível gerar e afinar as linhagens desejadas, a partir de células somáticas humanas. Em suma, após se criarem as EBs a partir de CEPi, foi usado um meio de diferenciação quimicamente

definido para promover gradualmente a produção do tipos de células específicas dos órgãos. Por isso, usando um processo alvo e gradual de diferenciação, que segue uma cronologia de desenvolvimento normal, os investigadores modelaram o desenvolvimento da célula e/ou órgão com CEPi humanas (Ueda *et al.*, 2010).

A diferenciação deve ser confirmada ao mostrar-se a expressão dos fatores de transcrição ou marcadores de superfície. Aparentemente, a função dessas células diferenciadas será o último ponto de avaliação (Dimos *et al.*, 2008). Dimos e os seus colegas demonstraram que as células da pele, dos pacientes com esclerose lateral amiotrófica, ELA, poderia ser reprogramada e subsequentemente diferenciada em neurónios motor livres da doença (Dimos *et al.*, 2008). Também é de notar que Ebert *et al.* (2009) fez CEPi a partir de fibroblastos de um paciente com SMA e da sua mãe não afetada. Eles foram os primeiros a demonstrar um fenótipo preservado de doença, específico do paciente, em neurónios motor, gerados a partir de fibroblastos de CEPi. O tratamento *in vitro* dessas células, com o ácido valpróico e com tobramicina, levou à *upregulation* de sobrevivência da síntese proteica dos neurónios motor e mostrou défices seletivos quando comparados com neurónios motor normais.

Hoje, muitas linhagens de CEPi poderiam ser dirigidas para tipos de células diferenciadas funcionais. Estão disponíveis as Auditory retinal cells (Jin *et al.*, 2009; Comyn *et al.*, 2010; Lamba *et al.*, 2010; Parameswaran *et al.*, 2010), os cardiomiócitos (Narazaki *et al.*, 2008; Pfannkuche *et al.*, 2009; Tanaka *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009; Carvajal-Vergara *et al.*, 2010; Kaichi *et al.*, 2010; Martinez-Fernandez *et al.*, 2010), os clusters excretoras de insulina (Tateishi *et al.*, 2008), os neurónios motor (Dimos *et al.*, 2008; Ebert *et al.*, 2009; Hu e Zhang, 2009; Karumbayaram *et al.*, 2009), os neurónios dopaminérgicos (Wernig *et al.*, 2008^a; Cai *et al.*, 2010; Swistowski *et al.*, 2010), auditory spignal ganglion neurons (Nishimura *et al.*, 2009), as células musculares lisas (Taura *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2009), as células do endotélio vascular (Taura *et al.*, 2009), as células dendríticas e os macrófagos (Senju *et al.*, 2009; Senju *et al.*, 2010), os adipócitos (Tashiro *et al.*, 2009; Taura *et al.*, 2009), osteoblastos (Tashiro *et al.*, 2009); as células hematopoiéticas (Kauffman, 1993; Lu *et al.*, 2009; Okabe *et al.*, 2009; Raya *et al.*, 2009; Kaneko *et al.*, 2010) e as células endoteliais progenitoras (Xu *et al.*, 2009; Abaci *et al.*, 2010; Alipio *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2010; Homma *et al.*, 2010).

Além disso, Hanna *et al.* mostraram que as CEPi diferenciadas podem ser usadas para resgatar a função dos órgãos, em modelos de ratinho humanizado de anemia falciforme (Hanna *et al.*, 2007). Mais recentemente, muitos outros grupos demonstraram o potencial terapêutico da CEPi, sozinhas ou em combinação com terapias genéticas corretivas (Tabela 5.1). Eles incluíram a geração de progenitores hematopoiéticos livres de doença, a partir de queratinócitos obtidos de pacientes com anemia de Fanconi (Raya *et al.*, 2009), a correção da hemofilia em ratinhos, usando CEPi derivadas de progenitores endoteliais (Xu *et al.*, 2009), e a reparação funcional multilinhagem do tecido cardíaco doente em ratinhos imunocompetentes, usando CEPi (Nelson *et al.*, 2009). Finalmente, puderam ser gerados neurónios produtores de dopamina funcionais, a partir de fibroblastos reprogramados de ratinho, e a transplantação desses neurónios poderia restaurar a função da dopamina quando enxertada em ratinhos Parkinsonianos (Wernig *et al.*, 2008a).

Referências bibliográficas

- Aasen et al (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26(11):1276-1284
- Abaci HE et al (2010) Adaptation to oxygen deprivation in cultures of human pluripotent stem cells, endothelial progenitor cells, and umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol*

Cell Physiol 298(6):C1527—C1537

Agarwal S et al (2010) Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenita patients. *Nature* 464(7286):292-296

Alipio Z et al (2010) Sustained factor VIII production in hemophilic mice 1 year after engraftment with induced pluripotent stem cell-derived factor VIII producing endothelial cells. *Blood Coagul Fibrinolysis* 21(5):502-504

Arbel G et al (2010) Methods for human embryonic stem cells derived cardiomyocytes cultivation, genetic manipulation, and transplantation. *Methods Mol Biol* 660:85-95

Baek KH et al (2009) Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature* 459(7250):1126-1130

Banerjee I et al (2011) Impact of co-culture on pancreatic differentiation of embryonic stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 5(4):313-323

Blelloch R et al (2007) Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell* 1(3):245-247

Cai J et al (2010) Dopaminergic neurons derived from human induced pluripotent stem cells survive and integrate into 6-OHDA-lesioned rats. *Stem Cells Dev* 19(7):1017-1023

Carvajal-Vergara X et al (2010) Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 465(7299):808-812

Chan EM et al (2009) Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotechnol* 27(11): 1033-1037

Colman A, Dreesen O (2009) Pluripotent stem cells and disease modeling. *Cell Stem Cell* 5(3):244-247

Comyn O et al (2010) Induced pluripotent stem cell therapies for retinal disease. *Curr Opin Neurol* 23(1):4-9

Daley GQ et al (2009) Broader implications of defining standards for the pluripotency of iPSCs. *Cell Stem Cell* 4(3):200-201; author reply 202

Dick E et al (2010) Evaluating the utility of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells for drug screening. *Biochem Soc Trans* 38(4):1037-1045

Dimos JT et al (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321(5893):1218-1221

Doetschman TC et al (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87:27-45

Ebert AD et al (2009) Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457(7227):277-280

Ellis J et al (2009) Alternative induced pluripotent stem cell characterization criteria for in vitro applications. *Cell Stem Cell* 4(3):198-199; author reply 202

Gamm DM, Meyer JS (2010) Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells: a retina perspective. *Regen Med* 5(3):315-317

Gearhart J (1998) New potential for human embryonic stem cells. *Science* 282(5391):1061-1062

Gerbal-Chaloin S et al (2010) Isolation and culture of adult human liver progenitor cells: in vitro differentiation to hepatocyte-like cells. *Methods Mol Biol* 640:247-260

Ghodsizadeh A et al (2010) Generation of liver disease-specific induced pluripotent stem cells along with efficient differentiation to functional hepatocyte-like cells. *Stem Cell Rev* 6(4):622-632

Grigoriadis AE et al (2010) Directed differentiation of hematopoietic precursors and functional osteoclasts from human ES and iPS cells. *Blood* 115(14):2769-2776

Hanna J et al (2007) Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318(5858):1920-1923

Hargus G et al (2010) Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(36):15921-15926

Hemberger M et al (2009) Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(8):526-537

Ho PJ et al (2010) Endogenous KLF4 expression in human fetal endothelial cells allows for reprogramming to pluripotency with just OCT3/4 and SOX2—brief report. *Arterioscler*

Thromb Vase Biol 30(10):1905-1907

Homma K et al (2010) Sirt 1 plays an important role in mediating greater functionality of human ES/iPS-derived vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 212(1):42-47

Hotta A et al (2009) Isolation of human iPS cells using HOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nat Methods* 6(5):370-376

Hu BY, Zhang SC (2009) Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat Protoc* 4(9):1295-1304

Huang HP et al (2010) Factors from human embryonic stem cell-derived fibroblast-like cells promote topology-dependent hepatic differentiation in primate embryonic and induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem* 285(43):33510-33519

Huangfu D et al (2008) Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26(11):1269-1275

Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33(suppl):245-254

Jin ZB et al (2009) Induced pluripotent stem cells for retinal degenerative diseases: a new perspective on the challenges. *J Genet* 80 (4):417-424

Kaichi S et al (2010) Cell line-dependent differentiation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes in mice. *Cardiovasc Res* 88(2):314-323

Kaneko S et al (2010) Reprogramming adult hematopoietic cells. *Curr Opin Hematol* 17(4):271-275

Karumbayaram S et al (2009) Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells* 27(4):806-811

Kauffman SA (1993) *Self-Organization and Adaptation in Complex System*. Oxford University Press. Oxford

Kawaguchi J et al (2005) Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone* 36(5):758-769

Khan IF et al (2010) Engineering of human pluripotent stem cells by AAV-mediated gene targeting. *Mol Ther* 18(6):1192-1199

Kim JB et al (2009b) Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461(7264):649-653

Kim K et al (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467(7313):285-290

Lamba DA et al (2010). Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 5(1):e8763

Lee G et al (2009) Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461(7262):402-406

Lee G et al (2010) Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 5(4):688-701

Li W et al (2009) Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 4(1):16-19

Liu H et al (2010) Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. *Hepatology* 51(5):1810-1819

Loh YH et al (2010) Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell* 7(1):15-19

Lowry WE et al (2008) Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(8):2883-2888

Lu M et al (2009) Enhanced generation of hematopoietic cells from human hepatocarcinoma cell-stimulated human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Exp Hematol* 37(8):924-936

Maehr R et al (2009) Generation of pluripotent stem cells from patients with type I diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(37):15768-15773

Maherali N et al (2007) Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1(1): 55-70

Maherali N et al (2008) A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3(3):340-345

Mali P et al (2008) Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells* 26(8):1998-2005

Marchetto MC et al (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143(4):527-539

Martinez-Fernandez A et al (2010) c-MYC independent nuclear reprogramming favors cardiogenic potential of induced pluripotent stem cells. *J Cardiovasc Transl Res* 3(1):13-23

Mattis VB, Svendsen CN (2011) Induced pluripotent stem cells: a new revolution for clinical neurology? *Lancet Neurol* 10(4):383-394

Meissner A et al (2007) Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 25(10):1177-1181

Moretti A et al (2010) Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl Med* 363(15):1397-1409

Meyer JS et al (2009) Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(39):16698-16703

Narazaki G et al (2008) Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118(5):498-506

Nelson TJ et al (2009) Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation* 120(5):408-416

Nishimura K et al (2009) Transplantation of mouse induced pluripotent stem cells into the cochlea. *Neuroreport* 20(14):1250-1254

Okabe M et al (2009) Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. *Blood* 114(9):1764-1767

Okita K et al (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448(7151):313-317

Osafune K et al (2008) Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol* 26(3):313-315

Parameswaran S et al (2010) Induced pluripotent stem cells generate both retinal ganglion cells and photoreceptors: therapeutic implications in degenerative changes in glaucoma and age-related macular degeneration. *Stem Cells* 28(4):695-703

Park IH et al (2008a) Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134(5):877-886

Park IH et al (2008b) Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134(5):877-886

Pfankuche K et al (2009) Cardiac myocytes derived from murine reprogrammed fibroblasts: intact hormonal regulation, cardiac ion channel expression and development of contractility. *Cell Physiol Biochem* 24(1-2):73-86

Polo JM et al (2010) Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 28(8):848-855

Rathjen J, Rathjen PD (2003) Lineage specific differentiation of mouse ES cells: formation and differentiation of early primitive ectoderm-like (EPL) cells. *Methods Enzymol* 365:3-25

Rashid ST et al (2010) Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 120(9):3127-3136

Raya A et al (2009) Disease-corrected hematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460(7251):53-59

Saha K, Jaenisch R (2009) Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell* 5(6):584-595

Schenke-Layland K et al (2008) Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells* 26(6):1537-1546

Senju S et al (2009) Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27(5):1021-1031

Senju S et al (2010) Pluripotent stem cells as source of dendritic cells for immune therapy. *Int J Hematol* 91(3):392-400

Soldner F et al (2009) Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136(5):964-977

Somers A et al (2010) Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 28(10):1728-1740

Stadtfield M, Hochedlinger K (2010) Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 24(20):2239-2263

Stadtfeld M et al (2008) Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse, *Cell Stem Cell* 2(3):230-240

Stadtfeld M et al (2010) A reprogrammable mouse strain from gene-targeted embryonic stem cells. *Nat Methods* 7(1):53-55

Sun N et al (2009) Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(37):15720-15725

Swistowski A et al (2010) Efficient Generation of Functional Dopaminergic Neurons from Human Induced pluripotent Stem Cells under Defined Conditions. *Stem Cells* 28(10):1893-1904

Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast culture by defined factors. *Cell* 126(4):663-676

Takahashi K et al (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861-872

Tamaoki N et al (2010) Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *J Dent Res* 89(8):773-778

Tanaka T et al (2009) In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 385(4):497-502

Taranger CK et al (2005) Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 16(12):5719-5735

Tashiro K et al (2009) Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction. *Stem Cells* 27(8):1802-1811

Tateishi K et al (2008) Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 283(46):31601-31607

Taura D et al (2009) Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Lett* 583(6):1029-1033

Tchieu J et al (2010) Female Human iPSCs Retain an Inactive X Chromosome. *Cell Stem Cell* 7(3):329-342

Teramura T et al (2010) Induction of mesenchymal progenitor cells with chondrogenic property from mouse-induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram* 12(3):249-261

Thomson JA et al (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145-1147

Tolar J et al (2011) Hematopoietic differentiation of induced pluripotent stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I (Hurler syndrome). *Blood* 117(3):839-847

Tsuneto M et al (2003) In vitro differentiation of mouse ES cells into hematopoietic, endothelial, and osteoblastic cell lineages: the possibility of in vitro organogenesis. *Methods Enzymol* 365:98-114

Ueda T et al (2010) Generation of functional gut-like organ from mouse induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 391(1):38-42

Untenaehrer JJ, Daley GQ (2011) Induced pluripotent stem cells for modelling human diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2274-2285

Urbach A et al (2010) Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6(5):407-411

Utikal J et al (2009) Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci* 122(Pt 19):3502-3510

Wakayama T et al (2001) Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292(5517):740-743

Warren L 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

Wdziekonski B et al (2003) Development of adipocytes from differentiated ES cells. *Methods Enzymol* 365:268-277

Wernig M et al (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448(7151):318-324

Wernig M et al (2008) A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol* 26(8):916-924

Xie CQ et al (2009) A comparison of murine smooth muscle cells generated from embryonic

versus induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 18(5):741-748

Xu D et al (2009) Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(3):808-813

Yamanaka S (2009a) Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 460(7251):49-52

Yamanaka S (2009b) A fresh look at iPS cells. *Cell* 137(1):13-17

Yan X et al (2010) iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev* 19(2):469-480

Ye L et al (2009a) Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(24):9826-9830

Ye Z et al (2009b) Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood* 114(27):5473-5480

Ying QL, Smith AG (2003) Defined conditions for neural commitment and differentiation. *Methods Enzymol* 365:327-341

Yoshida Y, Yamanaka S (2010) Recent stem cell advances: induced pluripotent stem cells for disease modeling and stem cell-based regeneration. *Circulation* 122(1):80-87

Yu J et al (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318(5858):1917-1920

Zhang J et al (2009) Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 104(4):e30-e41

Zhou J et al (2010) High-Efficiency Induction of Neural Conversion in hESCs and hiPSCs with a Single Chemical Inhibitor of TGF-beta Superfamily Receptors. *Stem Cells* 28(10):1741-1750

Zhu H et al (2011) Investigating monogenic and complex diseases with pluripotent stem cells. *Nat Rev Genet* 12(4):266-275

Capítulo 6

Dificuldades para o Potencial Terapêutico das hiPSCs

Num metazoário todas as células possuem o mesmo conjunto de genes. As exceções a esta condição são as células das linhagens germinativas pós-meióticas, os linfócitos maduros e as células de espécies que exibem redução de cromossomas (Kloc e Zagrodzinska, 2001). Portanto, gerar uma célula pluripotente *in vitro* e direcionar a sua conversão para uma célula diferenciada com um destino específico, ou seja, rebobinar o relógio biológico de qualquer célula de mamífero para um estado embrionário e depois avançar esta célula de grande potencial para células da doença, representa uma abordagem racional e contínua na medicina regenerativa. Por outro lado, o controlo de qualidade e a segurança são as principais preocupações e existem vários desafios técnicos no uso de CEPi humanas no tratamento de várias doenças humanas irreparáveis. Para minimizar ou eliminar as alterações genéticas, em linhagens de CEPi, é necessário criar-se CEPi sem fatores humanos. Definir um fenótipo relevante de doença necessita de modelos *in vitro* e *in vivo*. Além disso, são necessárias estratégias de recombinação genética para se gerar marcadores para a diferenciação e correção de genes. A par disso, as linhagens repórteres específicas do tipo de células, as ferramentas de rastreamento de linhagem e as ferramentas para quebrar, reparar e super-expressar os genes devem ser desenvolvidas de maneira a modelar as doenças humanas (Saha e Jaenisch, 2009).

Uma vez que as funções celulares são influenciadas pela estimulação microambiental, é importante avaliar os resultados obtidos pelos estudos das CEPi, tendo em conta os métodos de reprogramação, as condições de cultura e os protocolos de diferenciação, os quais influenciam o resultado final (Daley *et al.*, 2009). Kim *et al.* (2010) revelou vários fatores importantes sobre a reprogramação e as CEPi resultantes: primeiro, a origem do tecido influencia a eficiência e fidelidade da reprogramação; segundo, existem diferenças substanciais entre as iPS e as células ES derivadas de embriões; terceiro, a tendência de diferenciação e o perfil de metilação das CEPi podem ser redefinidos; por fim, e inegavelmente, as CEE derivadas da TN são mais fielmente reprogramadas do que a maioria das CEPi geradas a partir de tecidos somáticos adultos (Kim *et al.*, 2010).

Além disso, devem ser usados controlos saudáveis de tipo selvagem, de maneira a determinar se as CEPi derivadas são específicas de uma certa linhagem celular ou pluripotência. Embora as linhagens humanas de CEE e CEPi estabelecidas possam ser usadas para este fim, adicionalmente, um painel de linhas derivadas do mesmo paciente ou de pacientes diferentes que sofrem da mesma doença poderia fornecer informações valiosas. Por outro lado, em doenças de um só gene, as CEPi geneticamente modificadas poderiam representar um controlo isogénico ideal (Colman e Dreesen, 2009; Saha e Jaenisch, 2009). No entanto, a geração isogénica de linhas de CEPi poderia somente ser aplicada a doenças com causas genéticas conhecidas (Mattis e Svendsen, 2011).

Embora ainda existam muitos desafios em relação à identidade das CEPi, até ao momento estão disponíveis alguns relatórios para uma visão global do fenótipo da doença *in*

vitro (Ebert *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2009; Raya *et al.*, 2009; Ye *et al.*, 2009). Uma vez que as linhas das CEE humanas mostram resultados variáveis na diferenciação das linhagens específicas (Osafune *et al.*, 2008), múltiplas linhas de CEPi geradas de um único paciente são extremamente favoráveis por causa do idêntico *background* genético que providenciam. Os desafios para a tecnologia de reprogramação podem ser sumariados da seguinte maneira:

1. As técnicas tradicionais de reprogramação podem não ser satisfatórias,
2. Presença de vetores virais,
3. Disponibilidade de protocolos fiáveis e repetíveis da diferenciação completa para um tipo de tecido à escolha,
4. Variabilidade na capacidade de se diferenciar numa população à escolha e células diferenciadas têm geralmente uma vida curta,
5. Necessidade de comparação de CEE/falta controlos próprios,
6. Aberrações em culturas prolongadas,
7. Fenótipos celulares não autónomos e doenças da idade,
8. Baixa penetração e fenótipos modestos ou indetetáveis para fatores poligénicos ou complexos (Mattis e Svendsen, 2011; Zhu *et al.*, 2011).

A falta de imunogenicidade tem sido a maior esperança para o uso de células adultas, derivadas de CEPi, costumizadas e específicas de paciente, para tratar pacientes com um largo espetro de doenças. No entanto, Zhao e os seus colegas mostraram muito recentemente que as CEPi produzidas por via viral ou epissomática são imunogénicas (Zhao *et al.*, 2011). Nesta simples mas inteligente abordagem experimental, os investigadores injetaram CEE autólogas, CEE não coincidentes e CEPi autólogas derivadas de fibroblastos fetais, nos ratos correspondentes. Surpreendentemente, as CEPi, assim como as CEE não coincidentes, foram rejeitadas pelo sistema imunitário. Como os vetores virais usados para a reprogramação poderiam ter sido responsáveis pela resposta imunitária, foram usados vetores epissómicos. Mesmo com estas definições, a rejeição imunitária foi persistente, embora com uma resposta mais fraca. No geral, os dados foram inesperados: no ensaio da formação do teratoma, as CEPi autólogas foram mais imunogénicas que as CEE compatíveis (Zhao *et al.*, 2011). Além disso, os autores sugeriram que a resposta imunodependente da célula T, em recipientes singénicos, pela expressão do gene anormal em algumas células diferenciadas a partir das CEPi, pode ser a razão para a imunogenicidade das CEPi neste estudo. Os perfis de expressão do gene dos teratomas, derivados das CEPi, foram analisados e foi descoberto que um grupo de nove genes estava expresso em níveis anormalmente altos. A expressão induzida de três dos 9 genes (Hormad1, Zg16 e Cyp3a11) preveniram a formação de teratoma pelas CEE não imunogénicas. Como resultado, Zhao *et al.* (2011) sugeriram que a expressão destes antígenos menores poderia ser outra prova relativamente à diferença epigenética entre as CEPi e as CEE.

Embora jamais se usem as CEPi imaturas para transplantação em configurações clínicas (Apostolou e Hochedlinger, 2011), as células diferenciadas derivadas das CEPi também podem ser imunogénicas. Tem sido mostrado que, após transplantação, as células derivadas das CEE poderiam expressar moléculas adicionais, enquanto estão a amadurecer *in vivo*, por isso, elas tornam-se mais imunogénicas (Swijnenburg *et al.*, 2005).

É evidente que ainda há questões importantes a resistir à acumulação esperançosa de dados relativos ao uso terapêutico das células estaminais. Taylor *et al.* (2011) escrutinaram a controvérsia sobre a imunogenicidade dos tecidos derivados de células estaminais. Os autores afirmaram que a documentação da expressão HLA (ou MHC), pelas CEE, ensombrou a realidade de que qualquer tecido derivado das células estaminais, se não forem geneticamente idênticos ao do recipiente, têm o potencial para induzir a rejeição de alotransplantes via

reconhecimento “indireto” (Taylor *et al.*, 2011). Além disso, a ausência da expressão das moléculas HLA não pode prevenir a rejeição imunológica devido à ativação das células NK (Bryceson e Long, 2008).

Embora ainda seja incerto que no futuro alguma das linhas das CEPi possam ser usadas para terapias celulares, deve ser bastante útil estabelecer um banco de CEPi de gradação clínica, com um repertório suficiente de tipos de HLA. Recentemente, Nakatsuji (2010) estimou que uma coleção de linhas de CEPi únicas, com alelos homozigóticos dos 3 *loci* do HLA (A, B e DR) poderia permitir uma correspondência total para 80-90% da população japonesa, com uma correspondência perfeita (Nakatsuji, 2010). Além disso, Tamaoki *et al.* (2010) tentaram usar células estaminais da polpa dentária para gerar um banco de CEPi contendo um repertório suficiente de tipos de HLA. Eles também reportaram a possibilidade de se identificar doadores homozigóticos para linhas de CEPi humanas, para a construção de tais bancos de tipos de HLA. O prático isolamento e manuseamento das células da polpa dentária pode facilitar a expansão do tamanho do banco em vários institutos e estabelecer mesmo um número de linhas homozigóticas de CEPi para os 3 *loci* de HLA (Tamaoki *et al.*, 2010). Em conclusão, estabelecer bancos de células estaminais que contenham células pluripotentes que são correspondentes próximas ou compatíveis com o HLA, juntamente com a indução de antígenos com tolerância imunológica específica, em vez das terapias imunossupressoras ao longo da vida, é a esperança para evitar a rejeição imunológica (Taylor *et al.*, 2011).

6.1 A Reprogramação é Necessária para as Terapias Regenerativas?

Juntamente com a discussão epigenética, outra questão importante é se é necessário reprogramar as células de volta ao estado celular estaminal pluripotente ou não. Para as terapias regenerativas a pluripotência pode não ser um pré-requisito para a geração de certos tipos de células diferenciadas.

A transdiferenciação experimental das células B em macrófagos e das células exócrinas pancreáticas em células beta produtoras de insulina fornece bons exemplos para a conversão direta de um tipo de célula em outra (Xie *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2008). Foi mostrado que a *overexpression* ou eliminação dos fatores individuais de transcrição mudam o destino das células em células somáticas (Hochedlinger e Plath, 2009). Além disso, cultivar as células estaminais em condições de cultura definidas pode iniciar os programas de diferenciação (Kocafe *et al.*, 2010). Recentemente, verificou-se também que a conversão direta de fibroblastos para neurónios funcionais, sem qualquer estágio pluripotente prévio, é possível (Vierbuchen *et al.*, 2010). Os fibroblastos também foram transdiferenciados em cardiomiócitos, usando um conjunto de 13 fatores remodeladores de transcrição e de epigenesia (Ieda *et al.*, 2010). Subsequentemente, somente três (GATA4, MEF2C e TBX5) foram considerados suficientes para conduzir o programa genético regulador da diferenciação do cardiomiócito (Lin *et al.*, 1997; Garg *et al.*, 2003; Gosh *et al.*, 2009).

Masip *et al.* (2010) descreveram as “células induzidas transdiferenciadas (iT)” como uma nova ferramenta para a modificação do destino da célula adulta. A interconversão entre células adultas de diferentes linhagens ontogênicas, por um processo de transdiferenciação induzido, é baseado na *overexpression* de um único ou um cocktail de fatores de transcrição. Uma vez que não há nenhuma tentativa de atingir através de um estado embrionário semelhante às células estaminais, as células iT podem fornecer uma alternativa à medicina regenerativa. Por outro lado, assim como as CEPi, elas também precisam de métodos seguros transitórios e/ou ferramentas não integrantes para a geração. Além disso, elas também precisam de avaliação *in vivo* para determinar a aptidão da sua transplantação e aplicabilidade na medicina regenerativa (Masi *et al.*, 2010).

Em conclusão, como afirmou Meissner, a identificação de potenciadores putativos, miRNAs e ARN de *large intergenic non-coding (linc)* pode ajudar-nos a adquirir conhecimentos mais profundos para a regulação transcricional e o papel das modificações epigenéticas (Meissner, 2010). No entanto, a corrente de informação vinda do campo, em rápida ascensão, dos ARN não codificantes, mostram claramente que estamos longe de perceber como a maquinaria epigénica opera as células (Meissner, 2010). As CEPi abriram uma nova era na medicina regenerativa, uma vez que o avanço significativo mais desejado na biologia celular seria o de obter uma resposta regenerativa genuína de uma célula pluripotente que pode diferenciar-se em quase todos os tipos de células. Além disso, as CEPi poderiam quebrar as barreiras da hipótese fundamental da biologia celular. Estas células não só mudaram as ideias largamente aceites e profundamente enraizadas sobre as células terminalmente diferenciadas na biologia do desenvolvimento, mas também nos ajudaram a perceber como as células usam o seu verdadeiro potencial para produzirem outros tipos de células. Ao compelirem os limites da biologia convencional, as CEPi abriram uma nova era para aqueles biólogos que, mais do que palavras, precisam de algumas fórmulas geradas a partir das leis fundamentais da matemática e da física, para perceberem o comportamento complexo e emergente do comprometimento da linhagem e da pluripotência. Há um campo emergente na biologia da célula, que visa clarificar a insondavelmente complexa interação dos genes, ao usar conceitos gerais ou princípios da física e da matemática para estabelecer uma sólida fundação teórica. Esses métodos quantitativos das transições de estado da célula dão-nos uma oportunidade para orientarmos as futuras experiências ao objetivo da dissecação e, portanto, dirigirmos os mecanismos de transição da células (Hanna *et al.*, 2010). Poderíamos dizer que as CEPi mudaram as mentes tão radicalmente que nós podemos estar prontos para usar os nossos *backgrounds* teóricos de uma maneira diferente.

Referências bibliográficas

- Apostolou E, Hochedlinger K (2011) Stem cells: iPS cells under attack. *Nature* 474(7350):165-166
- Bryceson YT, Long EO (2008) Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. *Curr Opin Immunol* 20(3):344-352
- Colman A, Dreesen O (2009) Pluripotent stem cells and disease modeling. *Cell Stem Cell* 5(3):244-247
- Daley GQ et al (2009) Broader implications of defining standards for the pluripotency of iPSCs. *Cell Stem Cell* 4(3):200-201; author reply 202
- Ebert AD et al (2009) Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457(7227):277-280
- Garg V et al (2003) GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 424(6947):443-447
- Ghosh TK et al (2009) Physical interaction between TBX5 and MEF2C is required for early heart development. *Mol Cell Biol* 29(8):2205-2218
- Hanna JH et al (2010) Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143(4):508-525
- Hochedlinger K, Plath K (2009) Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 136(4):509-523
- Ieda M et al (2010) Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142(3):375-386
- Kim K et al (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467(7313):285-290
- KIoc M, Zagrodzinska B (2001) Chromatin elimination-an oddity or a common mechanism in differentiation and development? *Differentiation* 68(2-3):84-91
- Kocaefe C et al (2010) Reprogramming of human umbilical cord stromal mesenchymal stem

cells for myogenic differentiation and muscle repair. *Stem Cell Rev* 6(4):512-522

Lee G et al (2009) Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461(7262):402-406

Lin Q et al (1997) Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 276(5317):1404-1407

Masip M et al (2010) Reprogramming with defined factors: from induced pluripotency to induced transdifferentiation. *Mol Hum Reprod* 16(11):856-868

Mattis VB, Svendsen CN (2011) Induced pluripotent stem cells: a new revolution for clinical neurology? *Lancet Neurol* 10(4):383-394

Meissner A (2010) Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat Biotechnol* 28(10):1079-1088

Nakatsuji N (2010) Banking human pluripotent stem cell lines for clinical application? *J Dent Res* 89(8):757-758

Osafune K et al (2008) Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol* 26(3):313-315

Raya A et al (2009) Disease-corrected hematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460(7251):53-59

Saha K, Jaenisch R (2009) Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell* 5(6):584-595

Swijnenburg RJ et al (2005) Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation* 112(9 Suppl):I166-I172

Tamaoki N et al (2010) Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *J Dent Res* 89(8):773-778

Taylor CJ et al (2011) Immunological considerations for embryonic and induced pluripotent stem cell banking. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2312-2322

Vierbuchen T et al (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463(7284):1035-1041

Xie H et al (2004) Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 117(5):663-676

Ye Z et al (2009) Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood* 114(27):5473-5480

Zhao T et al (2011) Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 474(7350):212-215

Zhou Q et al (2008) In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455(7213):627-632

Zhu H et al (2011) Investigating monogenic and complex diseases with pluripotent stem cells. *Nat Rev Genet* 12(4):266-275

Capítulo 7

Nova abordagem para entender a biologia das células estaminais

Colebrook (2002) afirma que estamos numa era pós-linguística e necessitamos de desenvolver teorias e abordagens que não sejam dependentes da língua. Por outro lado, na biologia, temo-nos dedicado firmemente só ao uso da linguagem para descrever eventos extremamente complexos e interativos. Se pensarmos que a matemática é a linguagem da natureza, então deveremos ser capazes de representar e perceber tudo à nossa volta através dos números. Emergem padrões quando transformamos esses números, de qualquer sistema, em gráficos. Por isso, existem padrões em qualquer parte da natureza (Aronofsky, 1998). Dá-se o nome de emergência à forma como os sistemas e padrões complexos surgem da multiplicidade de interações relativamente simples, por isso, a emergência é central às teorias dos níveis integrativos e dos sistemas complexos (Corning, 2002).

No entanto, na vigésimo século da ciência, eu assumo que nós somos como que humanos daltônicos em biologia, lembrando a história muito didática de Leon Lederman e Dick Teresi (1993), no seu livro chamado *A partícula de Deus*. Nesta história, alguns seres inteligentes de um planeta imaginário chamado Twilo, que não conseguem ver nitidamente o preto e branco, vêm ao planeta numa missão de boa vontade. Para lhes dar um pouco da nossa cultura, os anfitriões levam-nos a um jogo do Mundial de Futebol, o evento cultural mais popular do nosso planeta. Como não conseguem ver o preto e branco, eles assistem ao jogo muito educadamente mas com um ar confuso. Lederman continua:

No que concerne aos Twiloans, um monte de pessoas de calções curtos está a correr o campo para cima e para baixo, a chutar inutilmente as pernas no ar, batendo uns nos outros e a cair. Às vezes um oficial sopra um apito, um jogador corre para a linha lateral, fica lá, e estende ambos os braços sobre a cabeça enquanto os outros jogadores olham para ele. De vez em quando o guarda-redes cai inexplicavelmente para o chão, a multidão entusiasmou e um ponto é atribuído à outra equipa.

Os Twiloans ficaram 15 minutos totalmente mistificados. Então, para passar o tempo, eles tentaram perceber o jogo. Alguns usam classificações técnicas. Eles deduziram, em parte devido às roupas, que existem duas equipas em conflito uma com a outra. Eles mapearam os movimentos de vários jogadores e descobriram que cada jogador aparenta ficar mais ou menos numa certa posição geográfica dentro do campo. Eles descobriram que diferentes jogadores mostram diferentes movimentos físicos. Os Twiloans, assim como os humanos, clarificam a sua busca de significado pelo campeonato mundial de futebol dando nomes às diferentes posições de cada jogador. As posições são categorizadas, comparadas e contrastadas. Uma grande avanço ocorre quando os Twiloans descobrem que existe simetria em trabalho. Para cada posição da equipa A existe uma contraparte na equipa B.

A dois minutos do fim os Twiloans já compuseram uma dúzia de gráficos, centenas de tabelas e fórmulas, e pontuações sobre complicadas regras sobre os jogos de futebol. E ainda que as regras possam todas estar corretas, embora de maneira limitada, nenhum deles percebeu

a verdadeira essência do jogo. Então um insignificante Twiloan, que estava até então calado, diz de sua justiça. “Vamos postular,” ele arrisca nervosamente, “a existência de uma bola invisível.”

“O quê?”, responde o Twiloan mais velho.

Enquanto os mais velhos estavam a monitorizar aquilo que parecia ser o cerne do jogo, as idas e vindas dos vários jogadores e as demarcações do campo, o insignificante Twiloan mantinha os olhos no desenrolar de eventos raros, e ele encontrou um. Imediatamente antes do árbitro anunciar o resultado, e uma fração de segunda antes da multidão ir ao rubro, o jovem Twiloan apercebeu-se de uma momentânea protuberância no fundo da rede. O futebol é um jogo de resultados curtos, por isso houve poucas protuberâncias para se observar, e cada uma era muito fugaz. Mesmo assim, houve eventos suficientes para que o insignificante nota-se que a forma de cada protuberância era hemisférica. Daí a sua bárbara conclusão de que o jogo de futebol está dependente da existência de uma bola invisível (invisível, pelo menos para os Twiloans).

O resto do contingente de Twilo ouviu esta teoria e, embora a evidência empírica seja fraca, após muita discussão, eles concluíram que o jovem tinha algo. Um velho estadista do grupo – um físico, como se vê- observa que às vezes alguns raros eventos são mais brilhantes do que uma centena de eventos mundanos. Mas o argumento decisivo é o simples facto de que deve existir uma bola. Colocar a existência de uma bola, que sem razão aparente os Twiloans não conseguem ver, e de repente tudo faz sentido. O jogo faz sentido. Não só isso, mas sim todas as teorias, gráficos e diagramas compilados durante a última tarde continuam válidos. A bola simplesmente dá razão à regras.

Esta é a extensa metáfora para muitos puzzles da física e é especialmente relevante para os físicos de partículas. Nós não podemos perceber as regras (as leis da natureza) sem conhecermos o objeto (a bola) e, sem acreditar num lógico conjunto de leis, nós nunca deduziríamos a existência de todas as partículas” (Lederman e Teresi, 1993).

Nós devemos ter uma identidade *alien* num insondável complexo sistema de biologia da célula. De maneira a ganharmos uma perspectiva “nativa”, nós precisamos de pensar e olhar de maneira diferente para vermos todas as cores e formas. Pode haver várias maneiras de fazer isto, no entanto, nenhuma pode ser mais colorida e significativa como aquilo para que Benoit Mandelbroth nos chamou atenção. Mandelbroth assumiu intermináveis repetições da auto-semelhança para muitas das formas biológicas que existem, por exemplo, as árvores; cada uma das placas de ramificação é muito semelhante. O seu livro seminal, *The Fractal Geometry of Nature*, foi publicado em 1982. Este vagabundo matemático morreu aos 85 anos, deixando para trás a geometria fractal, que foi aplicada à física, à biologia, às finanças e a muitos outros campos. A sua autodescrição sumaria o que ele fez pela ciência (Hoffman, 2010):

Decidi ir para campos onde os matemáticos nunca irião porque os problemas eram mal expostos. Desempenhei um papel estranho que nenhum dos meus alunos se atreveria a desempenhar.

Olhando para a imagem abaixo, Fig. 7.1, embora seja a preto e branco, eu não posso deixar de pensar na quantidade de sentido da matemática e de previsão que nós precisamos em biologia. Seria possível construir tais células camada a camada? Seria possível explicar todos os eventos de todos os níveis dessa construção, através da ajuda da matemática e da física fundamental?

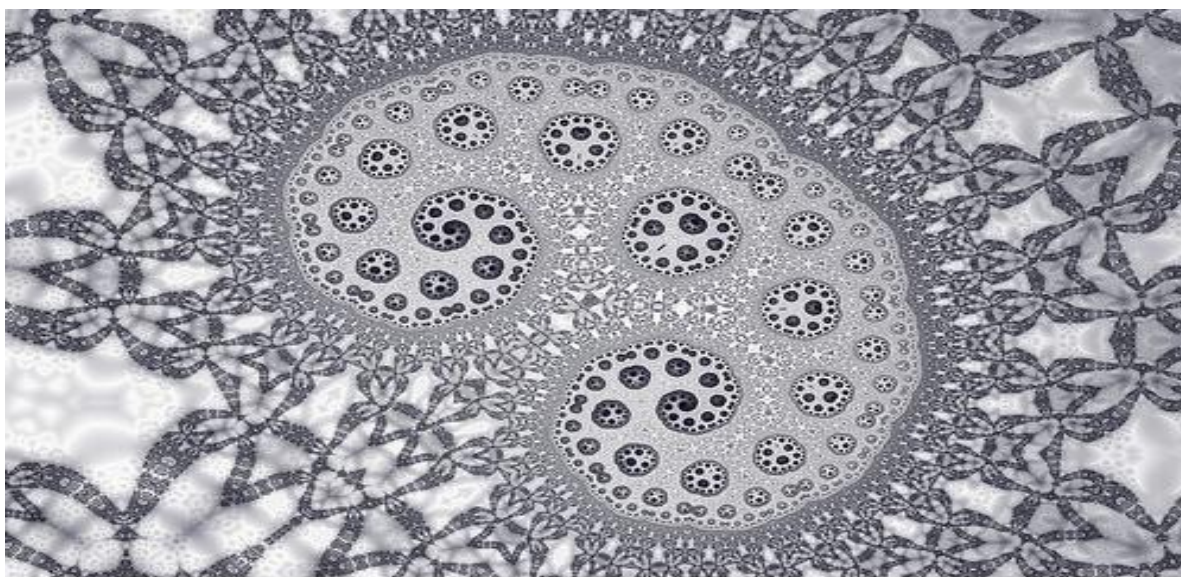


Fig. 7.1 Esta imagem é o resultado da forma fractal do $z = (z^*c+1) + 1/(z^*c+1)$ (Softologyblog, 2011)

Goodwin (1996), no seu livro *How Leopard Changed Its Spots*, define a unificação da biologia, física e matemática:

O resultado é a unificação da biologia, física e matemáticas, que é acelerada pelos estudos nas ciências da complexidade e a realização de que tipos similares da dinâmica do comportamento se criam a partir de sistemas complexos, independentemente da sua composição material e primariamente dependentes da sua ordem relacional – a maneira como as partes interagem ou estão organizadas. Deste modo a biologia torna-se mais física e matemática, colocando as percepções da genética, o desenvolvimento e os estudos evolucionários em termos dinâmicos mais precisos; ao mesmo tempo, a física torna-se mais biológica, mais evolucionária, com descrições da emergência das quatro forças fundamentais durante as etapas iniciais do *Big Bang* cósmicos, a sequência de crescimento das estrelas e a formação dos elementos durante a evolução estelar. Em vez da física e da biologia continuarem opostas, a primeira vista como a ciência da ordem racional deduzida a partir de leis fixas da natureza e mais tarde descrita (desde Darwin) como uma ciência histórica, a física tornou-se mais evolucionária e generativa, enquanto a biologia se tornou mais exata e racional. (p. 171)

7.1 Saúde Versus Doença

A transplantação da CEPi correta ou diferenciada para tecidos humanos doentes pode ser o mais desafiante problema para o prognóstico da tecnologia reprogramadora. O derradeiro e mais desejado objetivo na medicina regenerativa é substituir as células mortas ou não funcionais, que causam os sintomas de doenças, por células saudáveis produzidas em laboratório (Wilmot *et al.*, 2011). Nós podemos obter grandes quantidades de células e tecidos de um conjunto específico de pacientes; no entanto, ainda é incerto se as células que vêm da tecnologia reprogramadora irão reconstituir os tecidos afetados pela doença (Saha e Jaenisch, 2009). Agora, podemos pensar mais profundamente sobre se o corpo humano é uma máquina onde as peças avariadas podem ser substituídas por peças suplentes.

O livro de Goodwin (1996) que acima mencionámos introduz os conhecimentos mais atuais na teoria e complexidade evolutiva.. Ele define os organismos como:

Os organismos estão dotados com particularidades fortes que lhes conferem a capacidade de regenerar e reproduzir as suas próprias naturezas sob condições particulares, enquanto que os sistemas inanimados não.

Esta é uma propriedade emergente da vida que não é explicada pelas propriedades das moléculas, das quais os organismos são feitos, porque as moléculas não tem a capacidade de formar um todo a partir de uma parte. O ADN e o ARN podem fazer cópias deles mesmos em condições particulares, mas isto é um processo de autocópia, e não um em que um todo mais complexo é gerado a partir de uma parte. Esta é a principal razão para que os organismos não possam ser deduzidos aos seus genes ou moléculas. O tipo de organização particular que existe na ação dinâmica combinada das partes moleculares de um organismo, às quais chamei campo morfogenético ou de desenvolvimento, está sempre comprometido em fazer ou refazer-se em ciclos celulares e explorar o seu potencial para gerar novos todos.

Já recuperamos organismos como as entidades irreduzíveis que estão comprometidas no processo de geração de formas e transformam-se por via das suas qualidades particulares de ação e agência ou dos seus poderes casuais. Isto inclui particularidades hereditárias que dão aos organismos um tipo de memória, e as relações íntimas de dependência e influência entre organismos e os seus ambientes. O ciclo de vida inclui genes, influências ambientais e o campo generativo num processo singular que se fecha em si próprio e perpétua a sua natureza geração após a geração. As espécies de organismos são, por isso, espécies naturais, e não os indivíduos históricos do Darwinismo. Os membros de uma espécie expressão uma natureza particular (p176-177).

São lendárias as declarações de Goodwin, paralelas às do filósofo alemão Immanuel Kant, sobre a distinção entre mecanismos e organismos:

Kant descreveu um mecanismo como uma unidade funcional na qual as partes existem entre si na execução de uma função específica... Por outro lado, um organismo é uma unidade funcional e estrutural na qual as partes existem para e por meio uma da outra na expressão de uma natureza específica. Isto significa que as partes de um organismo – folhas, raízes, flores, membros, olhos, coração, cérebro – não são feitos independentemente e depois montados, como numa máquina, surgem sim como o resultado das interações dentro do organismo em desenvolvimento. Elas são unidades funcionais e estruturadas resultantes da dinâmica auto-organizada e autogeradora (pág. 197).

As qualidades emergentes que são expressas na forma biológica estão diretamente ligadas à natureza de organismos como conjuntos integrados, que podem ser estudadas experimentalmente e estimuladas por modelos complexos não lineares (pág. 199)

Além disso, Goodwin explica como o nosso entendimento do ser humano influencia a maneira de se tratar a doença:

Se os humanos estão a ser percebidos essencialmente em termos dos genes e dos seus produtos, então a doença é corrigida pela sua manipulação. O resultado é a medicina baseada em medicamentos e aconselhamento genético ou engenharia. Estes podem ser bastante efetivos em certas circunstâncias, mas o tratamento médico baseado nesta abordagem foca-se na doença em vez da saúde (pág. 205)

Por fim o escritor cita as declarações de Ingold (1990):

Os organismos e as pessoas não são o efeito de causas moleculares e neuronais, de genes e traços, mas sim casos do desenrolar de todo o campo relacional. Eles são formados por relações que nas suas atividades criam uma nova.

Tais ideias inovadoras precisam de ultrapassar fortes entraves por parte dos biólogos celulares que são muito leais às teorias convencionais da vida. Felizmente, essas ideias estão

a surgir, tanto quanto possível, com matemática e física simples.

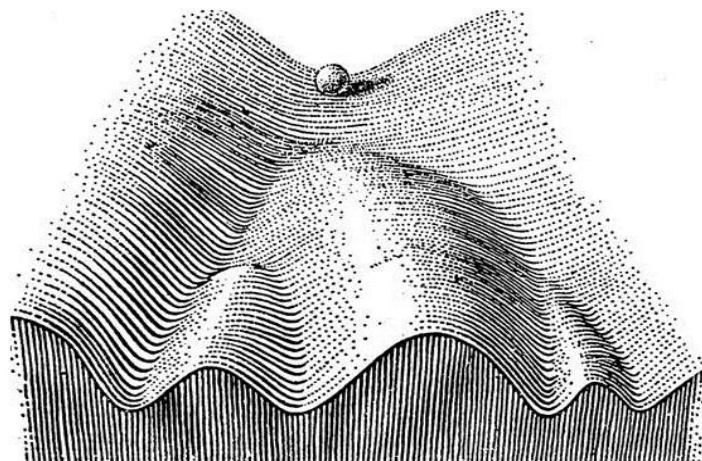
7.2 Mudança de Paradigma: Reprogramação como um Processo Raro, mas Robusto

Durante o desenvolvimento existe uma perda gradual da potência diferenciadora, seguindo-se da totipotência para pluripotência e multipotência em linhagens de células comprometidas para a diferenciação terminal (Hemberger *et al.*, 2009). Este pensamento foi, durante muitos anos, largamente aceite e profundamente enraizado na biologia de desenvolvimento, uma vez que, quando uma célula se diferencia terminalmente e se torna comprometida com uma linhagem, ela perde o potencial de produzir outros tipos de células (Huang, 2009).

Nos finais da década de 1950, Waddington introduziu o termo epigenética para descrever o desdobramento do programa genético de desenvolvimento. Para Waddington, a epigenética não era muito diferente da embriologia, mas foi uma teoria de desenvolvimento que propôs que o embrião prematuro era indiferenciado e ele mudou-a para epigenética (Waddington, 1959). A sua paisagem epigenética é uma metáfora para representar a forma como as decisões do desenvolvimento são feitas. Uma metáfora comum era uma bola colocada numa paisagem, onde a forma da paisagem “atrai” a bola fazendo com que ela siga certos canais e termine em certos sítios (Fig. 7.2). Esses pontos mais baixos representam o eventual destino da célula, ou seja, o tipo de tecido. Todas as células no embrião evoluiriam de acordo com as mesmas leis, mas devido à existência de sinais indutores, as células em diferentes regiões seguiriam diferentes caminhos e terminariam em diferentes atratores, o que pode ser elegantemente associado com diferentes estados da diferenciação terminal. Uma vez no seu vale final, a bola não pode atravessar facilmente a montanha para outros vales ou voltar ao princípio (Waddington e Robertson, 1966; Slack, 2002).

Uma vez que as experiências NT mostraram que o núcleo da grande maioria, se não de todas, as células adultas retém a plasticidade nuclear e pode ser reiniciado para um estado embrionário (Byrne *et al.*, 2007), a recente reversão inovadora desta assumida e potencial irreversibilidade do processo evolutivo, pela derivação das CEPi de rato, a partir de fibroblastos dérmicos, surpreendeu muito biólogos celulares (Takahashi e Yamanaka, 2006). Enquanto a metáfora da paisagem epigenética de Waddington está disponível para perceber o estado da diferenciação da célula, mais explicações são necessárias para perceber a natureza molecular e as barreiras epigenéticas para a reprogramação. É óbvio que a determinação do destino da célula e a reprogramação são sistemas complexos, pela emergência de padrões de sinais genéticos e epigenéticos divergentes.

Fig. 7.2 Na paisagem de Waddington [da referência Waddington (1957)] a bola representa um ovo fertilizado totipotente. Ele irá diferenciar-se em várias linhagens enquanto a bola rola pelo vale.



7.3 Do Reduccionismo para o Todo

Como Sui Huang (2011) afirmou claramente, as vias moleculares, tipicamente esquematizadas sob a forma de um diagrama de setas ($A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow \text{etc.}$), representam cascatas bioquímicas e são vistas como a personificação molecular de cadeias para muitos dos fenótipos celulares. Por isso, os investigadores preferiram usar esse diagrama de setas de maneira a explicarem as decisões do destino da célula, levando a descrever muitos fenótipos celulares. No entanto, o grande fluxo de dados da expressão do genoma, a par com muitos dados “omics”, enfraqueceu muito esta confortável noção. Estes recentes dados despoletaram a insondável complexidade das redes moleculares com as suas impenetráveis densidades e, por isso, as abordagens redutivas dos diagramas de setas da biologia celular perderam a sua clareza e simplicidade (Huang e Wikswow, 2006). Impedir o desenvolvimento de conceitos para a compreensão das partes coletivas é a maior complicação de esforços para descobrir a pluripotência e os seus alvos moleculares. A necessidade de abordagens integrativas, sob a forma de redes, começou a ser percebida entre os cientistas em meados do século XX (Kauffman, 1969). Hoje, os comportamentos coletivos *emergentes*, por exemplo, pluripotência *versus* comprometimento de linhagem, podem ser explicados pelas escolhas binárias embutidas ao nível do regulamentar comportamento da rede celular projetada, o que está longe da simples explicação casual linear (Huang, 2011).

Sui Huang, um dos pioneiros da biologia sistémica, está a oferecer padrões ou princípios simples e generalizáveis, que podem ser apreendidos pelas mentes humanas que não resistem à complexidade das interações moleculares. Este fundamento teórico está disponível para satisfazer a nossa compreensão intuitiva, pela consistência com os princípios físicos e matemáticos (Huang, 2011).

Huang (2004) tentou estabelecer um quadro de trabalho pedagógico para descrever as fontes dos estados celulares, através da ajuda de sistemas dinâmicos integrados complexos de alta dimensão. Huang usou o natural e esperado carácter de pluripotência “o ponto de partida” para explicar a raridade e robustez dos eventos de reprogramação (Figs. 7.2, 7.3).

De forma a percebermos o básico da teoria dos sistemas dinâmicos, precisamos de nos familiarizar com os estados espaciais, os atratores e as redes reguladoras. Por isso, podemos pegar na bola da paisagem de Waddington e de atirá-la para dentro de uma taça. A bola irá andar à volta na taça até que, eventualmente, acabe por repousar no ponto mais baixo da taça. Na dinâmica de sistemas esse ponto é chamado de atrator (porque a bola foi “atraída” para esse ponto). Sem grandes perturbações, o sistema acaba preso num atrator particular. Agora, toda a bola é o que a dinâmica de sistemas chama de bacia de atração desse sistema (Kauffman, 1993). Em biologia celular, as bacias estão separadas por alguns estados instáveis, o que constitui as barreiras epigenéticas. Assim que um atrator for atingido, o padrão de expressão associado é mantido (Huang, 2009).

O estado espacial é simplesmente um mapa imaginário de todas as possibilidades abertas ao sistema, por exemplo, para uma moeda atirada só existem dois pontos, a cara e a coroa. Na biologia celular são os circuitos reguladores do gene. Se para um circuito biestável regulador do gene, por exemplo, o gene 1 (incondicionalmente) inibe o gene 2 ou vice-versa, só há 2 possibilidades: $X_1 \geq X_2$ ou $X_1 \leq X_2$ (Fig. 7.4a). Este 2-gene particular gera dois estados atratores distintos: S_A tem o padrão de expressão $X_1 \geq X_2$ e o S_B tem o padrão complementar $X_1 \leq X_2$. Uma vez que os dois atratores podem coexistir dentro das mesmas condições ambientais, o circuito é considerado biestável. Os estados atratores são robustos, “auto-estabilizadores”, estados distintos (Fig. 7.4b) (Huang, 2009, 2011).

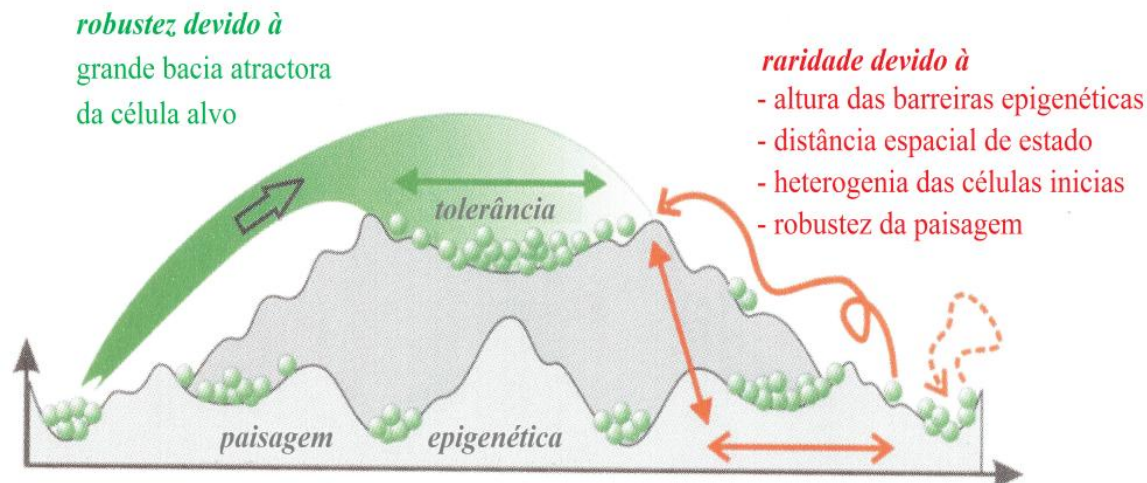


Fig. 7.3 Ilustração da coexistência da raridade e robustez na reprogramação do estado pluripotente (“jumping back”). Repare nos “subatratores” (“wash board potentials”) como manifestação da robustez da paisagem epigenética, que impõe estados intermédios que reduzem a velocidade dos eventos de reprogramação (com permissão de Huang, 2009).

Huang (2011) sumariza a dinâmica de rede da seguinte forma:

Um estado abstrato de rede $S(t) (x_1, x_2, \dots, x_n)$ no momento t , que também representa um perfil particular da expressão do gene, portanto, o estado de uma célula, é mapeado para um certo objeto caracterizado pela sua posição.

Uma rede inteira e o seu estado S , no momento t , aponta para um ponto no espaço de estado. A trajetória no espaço de estado captura as mudanças coordenadas na expressão do gene, como ditado pela rede regulamentar do gene. Uma vez que a rede de estado S também representa um perfil de expressão do gene, que por sua vez determina o fenótipo da célula, uma trajetória segue a mudança no fenótipo da célula. A trajetória do espaço de estado é, por isso, uma curva específica que realmente representa um processo de desenvolvimento, como a diferenciação. Ao contrário de uma seta num diagrama de rede ou um “pathway”, que é somente um símbolo estenográfico que foi sobre interpretado como uma explicação casual em biologia, a seta no estado de espaço ou trajetória (Fig. 7.4c) é uma entidade física formal e representa um processo biológico na sua totalidade; é um caminho verdadeiro.

Uma vez que todas as medidas sobre as redes moleculares são fotos de um momento fixo, tem de se ignorar as variações funcionais completamente potenciais. Se imaginarmos uma rede reguladora de gene como um estado de gene de expressões flutuantes, mesmo dentro de populações de células homogêneas, ter uma ideia clara acerca do estado funcional das células, usando valores de expressão mRNA vindos da análise *microarray* de ampla variedade, não seria ideal ou realista (Fig. 7.5).

Se voltarmos à paisagem epigenética de Huang (2009), na figura 7.3, somos capazes de ver que, na perspectiva dinâmica, as células individuais, em populações clonais, mostram flutuações nos seus níveis de expressão dentro da bacia do atrator e as células que a uma certa altura estão próximas do aro da bacia são mais recetivas aos sinais de diferenciação que as expulsam do atrator celular estaminal ou desestabilizam este último. Globalmente, os esforços para induzir as vias de diferenciação em células somáticas ou embrionárias indicam que uma vez excedidas as barreiras epigenéticas por qualquer evento reprogramador, então o destino da célula muda (Hochedlinger e Plath, 2009). Se as células estaminais contêm uma

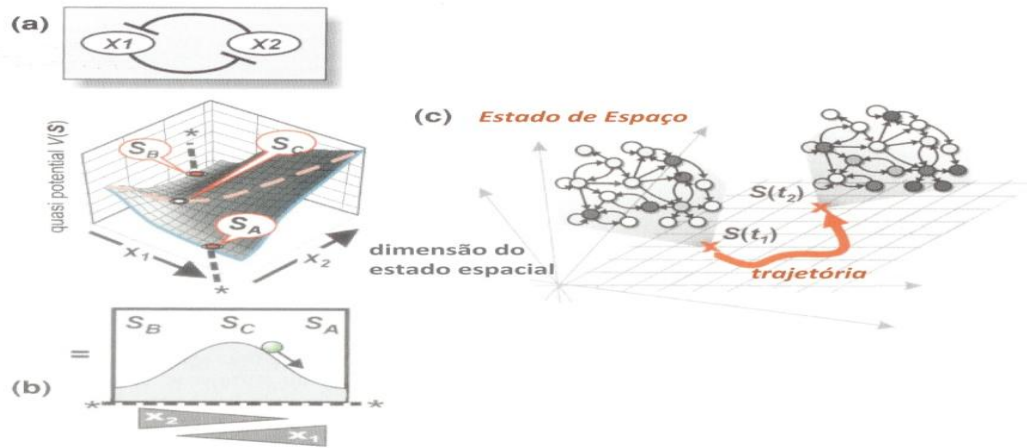


Fig. 7.4 A transformação da abordagem seta a seta para o sistema biológico, que usa estados espaciais, trajetórias e atratores. a. Arquitetura de dois inibidores mútuos de genes e exemplos dos circuitos reguladores de gene, usando as mesmas decisões binárias para a diferenciação em muitas células multipotentes. b. A *linha a tracejado* representa a separação, dividindo os estado espacial na base de atração. *Em baixo*: Representação esquemática simplificada, obtida a partir da secção da cruz ao longo da *linha a tracejado* *...*. c. Qualquer ponto no espaço representa um estado de rede (teórica) S no tempo t , definida pelo valor de expressão x da sub-rede de dois genes, $S = (x_1, x_2)$ (gene-padrão de expressão) no tempo t . Uma vez que, como a maioria dos estados, eles não representam uma rede de estados estáveis; consequentemente eles movem-se em estados espaciais ao longo de trajetórias (*linhas sólidas*) que levam ao estado atrator estável. A trajetória representa o movimento do estado que manifesta a relação regulatória ' X_1 inibe X_2 ' – no entanto, é modelada por outras entradas da rede. Todos, os estados S_1 e S_2 e a trajetória perturbada, se encontram dentro da região estado-espaco que 'drena' para o atrator particular S^* ; consequentemente, todos eles se encontram dentro das sua base de atração (com permissão de Huang, 2009 e 2011).

mistura heterogénea de micro estados, um para cada destino distinto, então transitar para cada um num equilíbrio dinâmico (dentro da base do atrator) é altamente possível, quando nenhum sinal de aviso externo de cometimento de destino está presente (Huang, 2009).

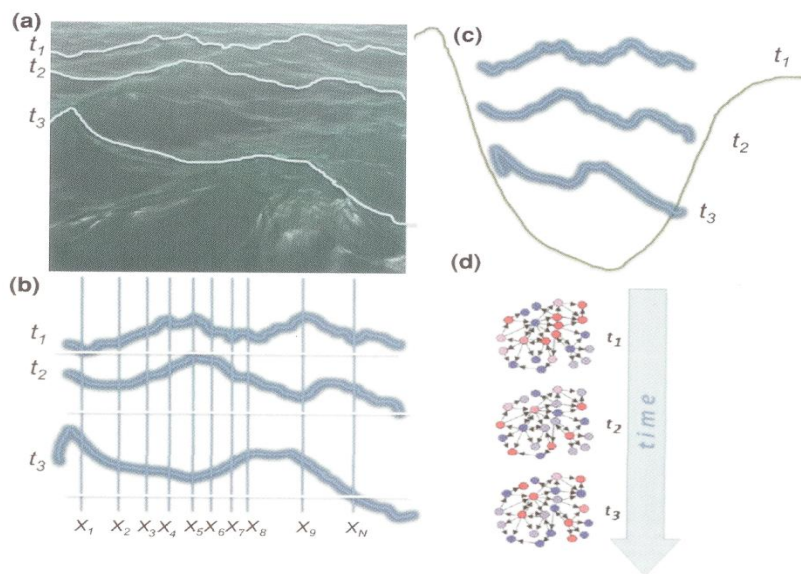


Fig. 7.5 Se considerarmos as expressões do gene num instante de um mar agitado (a), a expressão de cada gene individual X_1 para X_N flutuaria em cada minuto consequente (b), embora o fenótipo da

célula seja estável numa base de flutuações de limites permitidos (c). Em vez de descrever as interações dos genes de uma maneira seta-seta, uma representação gráfica de toda a rede daria um ideia melhor através de um sistema dinâmico como uma rede molecular (d). (A representação gráfica em d é mostrada com a permissão do Dr. Sui Huang)

Desde que Ying *et al.* (2008) apresentou que as CEE têm um programa inato para a auto-replicação, que não requer instrução extrínseca; o caráter de estado base da pluripotência pode ser aceite como o estado natural por defeito. Então, com a ajuda do complexo sistema dinâmico de alta dimensão, de Huang (2009), nós podemos perceber porque a reprogramação de pluripotência é robusta, mas, no entanto, rara:

Uma vez que o estado pluripotente é um estado atrator com uma bacia bastante grande de atração, é robusto - um estado fundamental.

E a raridade dos eventos de reprogramação podem ser explicada devido à robustez da paisagem do atrator:

Somente uma pequena fração de células na população, isto é, aquelas cujo mapa do microestado de flutuação que, num padrão de expressão do gene, preenche algum requerimento de escorvamento, pode realmente ser suscetível para a natureza dos sinais de reprogramação. (Fig. 7.3) (Huang, 2009).

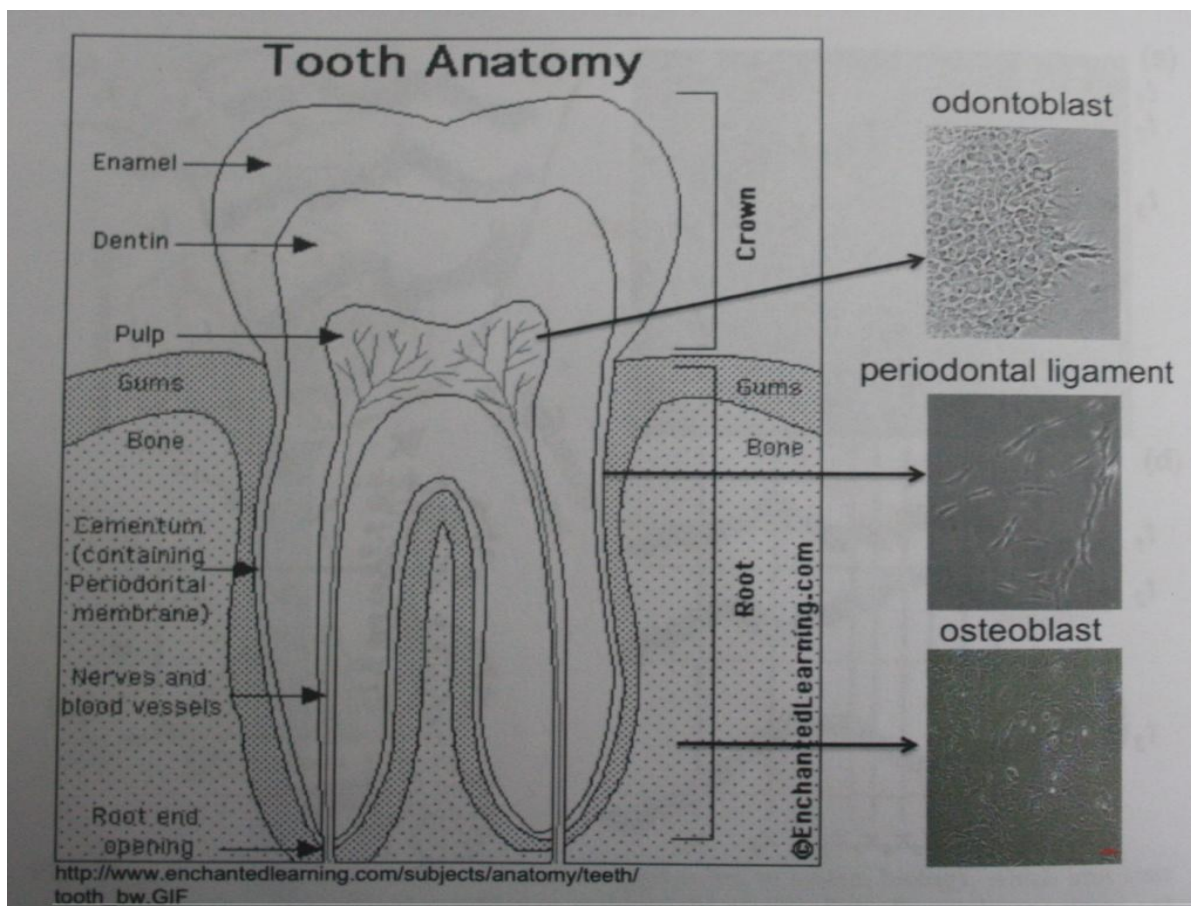


Fig. 7.6 Componentes do dente. Os odontoblastos, os ligamentos periodontais e os osteoblastos estão a secretar células de três tecidos relacionados, a dentina, a membrana periodontal e o osso alveolar

7.4 Mais Considerações Futuras

É óbvio que a diferenciação e o cometimento de linhagem garantem um modelo de estado fundamental. Se se pudesse empurrar as células oncogénicas fechadas para um lugar comum, os caminhos de diferenciação imitadores seguiriam as vias através da especificação celular apontada à identificação do primeiro precursor de linhagem. Por exemplo, os dentes e o osso alveolar podem servir como um modelo para pesquisar tais estreitas vias de diferenciação, uma vez que há tecidos especializados muito próximos numa localização anatómica. Esses tecidos são o osso alveolar da mandíbula, o ligamento periodontal, o cimento e a dentina da raiz do dente, que são secretados por células muito relacionadas: os osteoblastos, os fibroblastos dos ligamento periodontais, os cementoblastos e odontoblastos, respetivamente (Fig. 7.6).

São todos de origem mesenquimal, exceto os odontoblastos que têm origem neuroectodérmica (Koussoulakou *et al.*, 2009). Embora esses tecidos mostrem muitas diferenças funcionais e fisiológicas, não há marcadores específicos disponíveis para identificar as suas especificidades. Por outro lado, as propriedades mesenquimais das células estaminais dos ligamentos periodontais e as células da polpa dentária são quase idênticas (Huang *et al.*, 2009). As células estaminais da polpa dentária mostram uma diferença clara das outras células estaminais dos estromas do cordão umbilical de origem mesenquimal (Oktar *et al.*, 2011). No entanto, as tentativas de reprogramá-las para o estado iPS mostraram variados fenótipos que podem ser moderados através de passagens (Fig. 7.7) (Yildirim, observações não publicadas). Seria interessante investigar se essas discrepâncias morfológicas refletem os estados epigenéticos de diferentes, mas muito próximas de origens celulares, que surgem.

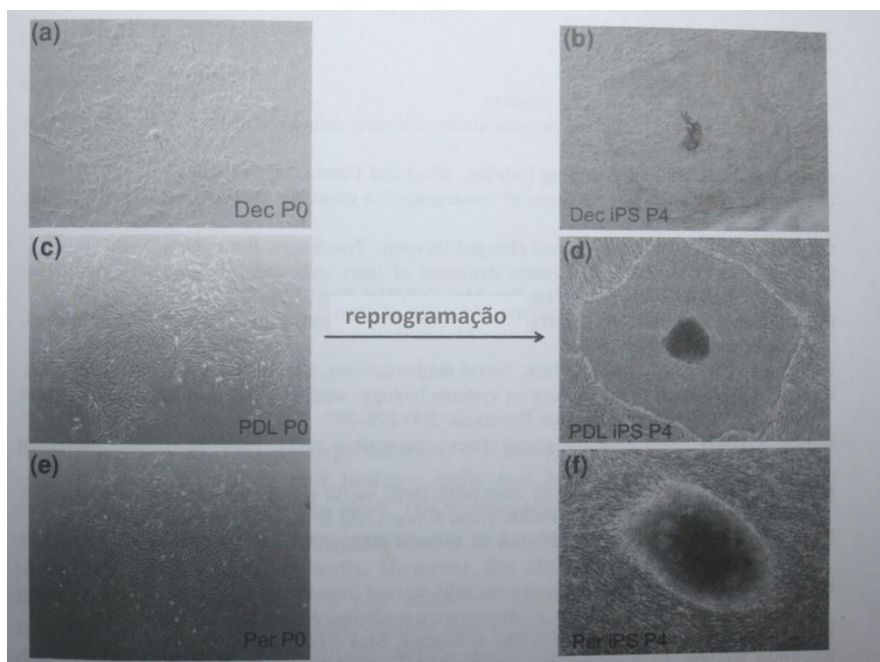


Fig. 7.7 Reprogramação das células estaminais altamente cologénicas, derivadas da (a) polpa dentária decídua (Dec), (c) ligamento periodontal (PDL), pertencente a um dente permanente, e (e) polpa dentária do mesmo dente permanente (Per), originou colónias de CEPi, que são morfológicamente diferentes (b-f)

Referências bibliográficas

- Aronofsky D (1998) Pi. USA: 84 minutes.
- Byrne JA et al (2007) Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 450(7169):497-502
- Colebrook C (2002) Understanding Deleuze. Allen and Unwin, Crows Nest
- Corning PA (2002) The re-emergence of "emergence": a venerable concept in search of a theory. *Complexity* 7(6):18-30
- Goodwin B (1996) How the leopard changed its spots. Touchstone Book, New York
- Hemberger M et al (2009) Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(8):526-537
- Hochedlinger K, Plath K (2009) Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 136(4):509-523
- Hoffman J (2010) Benoit Mandelbrot, Novel mathematician, Dies at 85. *New York Times* A28.
- Huang S (2004) Back to the biology in systems biology: what can we learn from biomolecular networks? *Brief Funct Genomic Proteomic* 2(4):279-297
- Huang S (2009) Reprogramming cell fates: reconciling rarity with robustness. *Bioessays* 31(5):546-560
- Huang S (2011) Systems biology of stem cells: three useful perspectives to help overcome the paradigm of linear pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2247-2259
- Huang S, Wikswa J (2006) Dimensions of systems biology. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 157:81-104
- Huang GT et al (2009) Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 88(9):792-806
- Ingold T (1990) An anthropologist looks at biology. *Man (NS)* 25:208-229
- Kauffman S (1969) Homeostasis and differentiation in random genetic control networks. *Nature* 224(5215):177-178
- Kauffman SA (1993) Self-organization and adaptation in complex system. Oxford University Press, New York
- Koussoulakou DS et al (2009) A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *Int J Biol Sci* 5(3):226-243
- Lederman L, Teresi D (1993) The god particle if the universe Is the answer, what is the question?. Dell Publishing, New York
- Oktar PA et al (2011) Continual expression throughout the cell cycle and downregulation upon adipogenic differentiation makes nucleostemin a vital human MSC proliferation marker. *Stem Cell Rev* 7(2):413-424
- Saha K, Jaenisch R (2009) Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell* 5(6):584-595
- Slack JM (2002) Conrad Hal Waddington: the last renaissance biologist? *Nat Rev Genet* 3(11):889-895
- Softologyblog (2011) Archive for the 'Fractals' category. <http://softologyblog.wordpress.com/category/fractals/>
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663-676
- Waddington C (1957) The strategy of genes. George Allen & Unwin, London
- Waddington CH (1959) Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature* 183(4676) : 1654-1655
- Waddington CH, Robertson E (1966) Selection for developmental canalisation. *Genet Res* 7(3):303-312
- Wilmut I et al (2011) The evolving biology of cell reprogramming. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366 (1575):2183-2197
- Ying QL et al (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453(7194):519-523

Capítulo 8

Conclusão

No início a tecnologia da reprogramação celular surpreendeu muitos biólogos. As CEPi causaram uma verdadeira revira volta na biologia celular; as células podem ser reprogramadas no seu estado embrionário sempre que seja preciso. As técnicas evoluíram muito rapidamente e, hoje em dia, existem investimentos tremendos para o desenvolvimento robusto e caminhos específicos para gerar células pluripotentes ideais. No entanto, para se obterem as linhas pluripotentes, a sua diferenciação subsequente e caracterização, técnicas válidas e reagentes, de maneira a atingir uma grande qualidade e células progenitoras válidas, é necessário estas sejam mantidas sob condições controladas. Embora esses processos estejam a ajudar muito a resolver o maior problema da medicina, eles estão também a levar-nos a refletir mais profundamente sobre a saúde versus doença. Ainda assim, as CEPi teriam profundas implicações tanto para a pesquisa básica, como para as terapêuticas clínicas, ao proverem um sistema modelo específico do paciente para se estudar a patogénese da doença e o teste da efetividade dos agentes farmacológicos, assim como proverem recursos amplos de células autólogas que poderão ser usadas na transplantação.

Sobre o Autor

A autora

Sibel Yildirim é professora associada na Faculdade de Odontologia, do Departamento de Odontologia Pediátrica da Universidade de Selcuk, Konya, Turquia. É há muito anos professora e médica dentista na universidade. Ela e os seus colegas estabeleceram o primeiro centro multidisciplinar dentário/oral na Turquia. Foi autora de muitos artigos em jornais internacionais e completou muitos projetos de investigação. Juntamente com o seu doutoramento em Odontologia Pediátrica, tem também outro doutoramento em histologia e embriologia. Os seus campos de interesse incluem o papel das citoquinas na reabsorção do dente decíduo, a etiopatogenia viral das doenças da polpa/periapical dos dentes decíduos e as terapias vitais da polpa, usando proteínas humanas recombinantes ou terapia de genes. Consequentemente, ela levou a cabo algumas experiências no tecido da polpa dos dentes decíduos e a sua equipa obteve resultados importantes que mostram grande capacidade de regulação das células da polpa do dente em eventos de reabsorção ou retenção do dente decíduo.

Teve a oportunidade de estudar com os líderes incontestáveis no campo da engenharia odontológica, no Japão, na Suíça e nos Estados Unidos. Tornou-se uma especialista nas células estaminais dos tecidos da polpa dos dentes decíduos e permanentes. Ela e os seus colegas mostraram que as células estaminais dos tecidos da polpa dentária têm algumas diferenças claras em relação às células estaminais mesenquimais obtidas do estroma do cordão umbilical. Além disso, aos seus estudos sobre engenharia dos tecidos dentários, ela seguiu experiências de reprogramação em Genebra. Nesta parte dos seus estudos, ela tentou gerar células estaminais pluripotentes induzidas (CEPi) a partir de células estaminais da polpa de dentes decíduos vs. permanentes, assim como de células periodontais dos ligamentos e queratinócitos orais. Ela pôde observar que as células estaminais que têm origem dentária mostram um grande potencial para a reprogramação. Ela acredita mesmo que isolar células estaminais epiteliais e mesenquimais, de dentes decíduos, e torná-las em CEPi, irá apontar a novos locais para a restauração *in situ* da reparação de tecidos.

Como dentista pediatra, histologista e embriologista, ela acredita que tem uma poderosa ferramenta para perceber a biologia da célula. Após longos anos de experiência em campos académicos, em três continentes diferentes, ela viu que se tornou, outra vez, numa estudante que está desejosa de ir para além das fronteiras tradicionais da biologia. Depois de ler os maravilhosos manuscritos de Sui Huang e de Stuart Kaufman, ficou totalmente convencida de que o campo da bio complexidade é o único que a ajuda atingir os objetivos, aproximando-se mais um passo de compreender a vida.

SPRINGER BRIEFS IN STEM CELLS

Sibel Yildirim

Induced Pluripotent Stem Cells



Springer

Preface

“The world is changing” is a classical concern for people over forties. However, the era we live is a little bit different than the previous generations. We are more likely in between classical and contemporary or between fictions and facts. Change is unbearably fast and the story of biology is still far from to be completed. It is only a few weeks ago (September 22, 2011) particle physicists on the particle detect or named “Oscillation Project with Emulsion-tRacking Apparatus (OPERA)” experiment detected neutrinos traveling faster than light. Although it is too early to declare Einstein’s theory of special relativity is wrong, results would be said being so revolutionary at least. The same has happened in cell biology in 2006. Shinya Yamanaka and his team discovered that the completely differentiated somatic cell could exert its embryonic stem cell state potential with the available conditions. The method for turning a somatic cell to a pluripotent one was relatively easy, at least easier than one could imagine till Yamanaka’s paper. They named those cells as induced pluripotent stem cells (iPSCs).

Science is used to have such sudden pulses. However, there is always a resistance to unexpected changes. It generally takes longer time than necessary to interpret the discoveries having results that are applicable to many situations. Some scientists want to directly apply those results to a daily life as quickly as possible, while the others, whom being fascinated by reaching one more level of endless mystery, display a tendency to beware there is actually more. However, some with a special consciousness embark through explorations of unknown realities.

The discovery of iPSCs brought about all. Now many researchers are trying to refine the technique to serve those cells to restore human health. Some of them are trying to reach the furthest point in the dark corridors of cell biology, while they are aware that the battery of their torch is pushing its limits. However, very few of them opened a completely renewed era in biology by mathematical biology.

This manuscript is trying to explain the fundamentals behind the iPSCs and its applications. Most importantly, it attempts to show why we have to use mathematics to go further with iPSCs or another yet undiscovered cells. The theories of Stuart Kauffman and Sui Huang pointed out the ways to solve many problems in

cell biology and are being pored over by many people to quench their intellectual thirst. Dr. Huang is showing bravely how impossible to fathom by common sense of all data flooding from ‘omics’ works of biology. Fortunately, he is using general concepts or principles of physics and mathematics to establish a firm theoretical foundation.

Researchers from my team started from tooth regeneration and inescapably ended up with stem cell biology. I individually had begun to be involved in microbial aspects of dental diseases. Now I am being captivated by complexity and system biology, because it is hard not being exposed to the emergent patterns of every system that has a common connection: mathematics. Obviously iPSCs are providing great tools to study every aspects of biology, fundamentals through applications. In conclusion, iPSCs opened minds of scientist by showing that we should compel our imagination limits to see more.

I am grateful to Sui Huang for his generous and humble guidance. Thanks to Kursat Turksen to find me sufficient to write this manuscript. Thanks to Springer’s publishing team, especially to Renata Hutter and Aleta Kalkstein for their kind assistance. Thanks also to Kamil Can Akçalı who encouraged me to follow my instincts. Last but not least thanks to Muammer Saglam for his unconditional love that led me to feel the light.

Contents

1 Introduction	1
References	2
2 Pluripotent Cells	5
2.1 Different Pluripotent Cells	5
2.2 Transcriptional Networks and Signaling Pathways of Pluripotency	6
2.2.1 Transcriptional Network of Pluripotency	8
References	9
3 Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)	11
3.1 Generation the First iPSCs	11
3.2 Reprogramming	12
3.2.1 Factor Delivery into Target Cells	12
References	17
4 Molecular Mechanisms of Pluripotency	21
4.1 Steps in Reprogramming	21
4.1.1 Increase in the Cell Cycle Rate	21
4.1.2 Morphological Changes	22
4.1.3 Late Events Toward Pluripotency	22
4.2 Mechanisms in Reprogramming	23
4.2.1 Genetic Factors	23
4.2.2 Signaling Pathways	24
4.3 Dynamics of Direct Reprogramming	25
4.4 Epigenetic Modifications	26
4.5 Similarities and Differences Between iPSCs and ESCs	27
References	29

5	Modeling Disease in a Dish	33
5.1	Disease-Specific iPSCs	34
5.2	Choosing Cell Sources	34
5.3	Identification of iPSC Colonies	40
5.4	Characterization of Genetic Mutation	42
5.5	iPSCs Differentiation into Desired Cell Types	42
	References	44
6	Challenges to Therapeutic Potential of hiPSCs	51
6.1	Is Reprogramming Necessary for Regenerative Therapies?	53
	References	55
7	New Approach to Understand the Biology of Stem Cells	57
7.1	Health Versus Disease	59
7.2	Changed Paradigm: Reprogramming as Rare But Robust Process	61
7.3	From Reductionism to Wholeness	62
7.4	More Future Considerations	66
	References	68
8	Conclusion	69
	About the Author	71
	Index	73

Chapter 1

Introduction

Although cell fates during development are neither restrictive nor irreversible, interestingly enough the deeply rooted attitude in cell biology has been that the terminally differentiated cells have lost the potential of producing other cell types (Huang 2009). The first study showed that the nuclei of frog blastula cells could produce complete embryos when transplanted into enclosed embryos (Briggs and King 1952). Only a few years later Gurdon et al. (1958) reprogrammed fully differentiated intestinal cells from *Xenopus* by frog oocytes. It took 20 years of incubation for Evans and Kaufman to publish the successful isolation of embryonic stem cells (ESCs) in 1981 (Evans and Kaufman 1981). Although changing a somatic cell fate was achieved using frog oocytes, somatic cell nuclear transfer (NT) could not be succeeded in other species until late 1990s. Then Wilmut et al. (1997) cloned sheep Dolly. The first successful derivation of human ESCs was reported a year after (Thomson et al. 1998). However, ethical complications and paucity of human egg cells for research purposes, extremely low efficiency, high technical difficulty levels and aberrant ploidy caused researches on ESCs much more controversial than expected (Walia et al. 2011).

Earlier studies showed that the 'terminally differentiated' state of human cells was not fixed, but could be altered, and the expression of previously silent genes typical of other differentiated states could be induced (Blau and Baltimore 1991; Bhutani et al. 2010; Yamanaka and Blau 2010). Accordingly, pluripotent stem cell lines can be generated directly from completely differentiated adult somatic cells using alternative approaches, such as nuclear transfer, cell fusion and direct reprogramming. When a nucleus from a differentiated somatic cell is transplanted into an enucleated oocyte, nuclear reprogramming is initiated, leading to cloning of the original somatic cell. These experiments clearly showed that cell specialization needs only change in gene expression, not in gene content and this process of differentiation can be fully reversed (Yamanaka and Blau 2010). Heterokaryons constitute another complementary approach to nuclear reprogramming and it involves cell fusion, in which two or more cell types fuse to form single entity. It has been shown that reprogramming in heterokaryons was influenced by DNA

methylation status, tissue of origin and the relative ratio of nuclei that dictates the balance of regulators (Blau and Baltimore 1991; Zhang et al. 2007). By using interspecies heterokaryons (mouse ESCs, human fibroblasts) Bhutani et al. (2010) have showed that mammalian AID is required for active DNA demethylation and initiation of nuclear reprogramming toward pluripotency in human somatic cells (Bhutani et al. 2010).

Intense effort to identify the master transcription factor of cell phenotypes have been exerted to support the idea that a small number of master transcription factors can control cell state in various cell types including reprogramming and trans-differentiation (Young 2011). Only in 2006, attempts to identify the main regulators of the ESC state was reached to a plateau with the study of Shinya Yamanaka and colleagues who showed that a combination of only four transcription factors could generate ESC-like pluripotent cells from mouse fibroblasts (Takahashi and Yamanaka 2006). These generated cells are called induced pluripotent stem cells (iPSCs). The discovery of factor-directed reprogramming had a seismic effect on stem cell biology and its potential application (Wilmut et al. 2011). Today many fundamental systems in biology are changing to accept that mature body cells could be reverted to an embryonic state without the help of eggs or embryos.

Thence, reprogramming not only sidesteps the necessity of using embryos to collect and culture ESCs, but also comes with the additional expected advantage of circumventing the immunological problems associated with engraftment, which includes transplant rejection and graft versus host disease. On the other hand the efficacy of the technique is just a wide place in the road. There are still many technical roadblocks in the process. This review will focus on the story of iPSCs that opened a new era in cell biology only in the very beginning of 2000.

References

- Bhutani N et al (2010) Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature* 463(7284):1042–1047
- Blau HM, Baltimore D (1991) Differentiation requires continuous regulation. *J Cell Biol* 112(5):781–783
- Briggs R, King TJ (1952) Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci USA* 38(5):455–463
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819):154–156
- Gurdon JB et al (1958) Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* 182(4627):64–65
- Huang S (2009) Reprogramming cell fates: reconciling rarity with robustness. *Bioessays* 31(5):546–560
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663–676
- Thomson JA et al (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145–1147

- Walia B et al (2011) Induced pluripotent stem cells: fundamentals and applications of the reprogramming process and its ramifications on regenerative medicine. *Stem Cell Rev* Jun 14. [Epub ahead of print]
- Wilmot I et al (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385(6619):810–813
- Wilmot I et al (2011) The evolving biology of cell reprogramming. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2183–2197
- Yamanaka S, Blau HM (2010) Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465(7299):704–712
- Young RA (2011) Control of the embryonic stem cell state. *Cell* 144(6):940–954
- Zhang F et al (2007) Active tissue-specific DNA demethylation conferred by somatic cell nuclei in stable heterokaryons. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(11):4395–4400

Chapter 2

Pluripotent Cells

2.1 Different Pluripotent Cells

The defining properties of ESCs are the ability to proliferate indefinitely without commitment to any cell lineages (self-renewal) and the capacity to differentiate into cell lineages from three germ layers (pluripotency) (Evans and Kaufman 1981; Thomson et al. 1998). ESCs were the first pluripotent cells isolated from normal embryos derived from the inner cell mass (ICM) of preimplantation embryos (Evans and Kaufman 1981). Mouse ESCs (mESCs) contribute cells to the three germ layers and to the germline of chimeric animals when injected into mouse blastocysts. However, there are distinguishing molecular and biological characteristics between ESCs and their *in vivo* counterparts of the ICM. Cells of the ICM do not self-renew, and they have globally hypomethylated genome (Santos et al. 2002), whereas, ESCs have unlimited proliferation potential and they have characteristically highly methylated genome (Meissner et al. 2008).

Although the first mESC lines were derived 25 years ago using feeder-layer-based blastocyst cultures, subsequent efforts to extend the approach to other mammals have been relatively unsuccessful. Human ESCs (hESCs) could only be isolated in 1998 (Thomson et al. 1998). Mouse and human embryonic stem cells share similar features such as their ICM origin and pluripotency. On the other hand, they do have differences. The differences are related to their morphology, marker expression, transcription factor binding activities and growth factor requirements in culture conditions. mESCs depend on leukemia inhibitory factor (LIF) and bone morphogenetic protein (BMP), whereas hESCs rely on activin and fibroblast growth factor (FGF) (Thomson et al. 1998).

In 2007, two independent groups showed that pluripotent cells could also be derived from the epiblast of the implanted embryo (Brons et al. 2007; Tesar et al. 2007). Mouse epiblast stem cells (EpiSCs) are derived from the post-implantation epiblast of day 5.5 embryos in the presence of bFGF and activin (Tesar et al. 2007). Although EpiSCs are able to differentiate *in vitro* into the teratomas including tissues belonging to the three embryonic germ layers, they do not contribute to chimeras.

Table 1 Different types of pluripotent cells and antagonistic actions of same signaling pathways on different states of pluripotency

	hESC	EpiSC	mESC
Pluripotency state	ICM-like	Post-implantation epiblast-like	ICM-like
Maturity state	Primed	Primed	Naïve
Morphology	Flattened monolayer	Flattened monolayer	Dome-shaped
Culture conditions	Activin A/bFGF	Activin A/bFGF	LIF/BMP4 2i
Pluripotency confirmation status	Teratoma formation	Teratoma formation	Tetraploid complementation Germline contribution
X chromosome inactivation	XaXi	XaXi	XaXa
BMP signaling	Induces differentiation	Induces differentiation	(+LIF) Stabilizes
TGF- β & FGF2	Support renewal	Support renewal	Induces differentiation
ERK1/2 pathway signaling	Requires	Requires	Self-renewal is enhanced by inhibition

Interestingly, hESCs share defining features with EpiSCs, yet are derived from preimplantation human embryos (Nichols and Smith 2009) (Table 1).

Pluripotent cell lines have also been derived from other embryonic and adult tissues. Embryonic germ cells (EGCs) have been derived from the primordial germ cells (PGCs) of the midgestation embryo (Matsui et al. 1992) and adult germline stem cells (male germ cells and spermatogonial stem cells) (Surani 1999) have been generated from explanted neonatal (Kanatsu-Shinohara et al. 2004) and adult (Guan et al. 2006) mouse testicular cells.

Moreover, in 2008 Chou et al. reported distinct pluripotent cells derived from blastocyst, which were defined by FGF2, activin and BIO. The authors called those cells FAB-SCs and showed that they share EpiSCs markers. However, FAB-SCs were unable to differentiate unless exposed to LIF/BMP4 (Chou et al. 2008).

With the discovery of EpiSCs, there is an emerging concept that different pluripotent states could exist, and knowledge of both transcriptional networks and signaling pathways has been vital for the precise description and dissection of the pluripotent state.

2.2 Transcriptional Networks and Signaling Pathways of Pluripotency

Different pluripotent cell types can be characterized and classified by their different growth requirements, developmental properties and pluripotency states (Table 1):

1. ICM-like pluripotent state: ESCs derived from ICM, embryonic germ cells and male germ cells or spermatogonial stem cells.
2. The post-implantation epiblast-like state: EpiSCs

These two states depend on signaling pathways that often antagonize each other (Hanna et al. 2010b). On the other hand, Nichols and Smith designated pluripotent cells as na and primed according to their maturity state of pluripotency (Nichols and Smith 2009). Isolated from the ICM of preimplantation blastocysts in the presence of LIF and BMP, mESCs fulfill all criteria of pluripotency. Therefore, they have been accepted as they are in “na” pluripotent state. On the other hand, EpiSCs are referred to as “primed” pluripotent cells because they exhibit only some pluripotency criteria.

Apart from the contribution to blastocyst chimeras, there are more differences between na and primed pluripotent states (Table 1): While na pluripotent cells show low susceptibility for primordial germ specification and high single-cell clonogenicity, primed cells display the reverse. While mESC colonies display compact dome-shaped morphologies, both hESCs and EpiSCs grow as a flat monolayer and the positive regulators of both the states are WNT and IGF. Na pluripotent cells require LIF/Stat3 and BMP4 signaling, whereas primed pluripotent cells need TGF- β , activin, FGF2, ERK1/2 signals. Interestingly enough, the two signals antagonize each other: BMP4 in EpiSCs and TGF- β , activin, FGF2, ERK1/2 in na cells induce differentiation. Na pluripotent cells generally do not express lineage specification markers (FGF5, Blimp1, Cer 1). However, these markers are positive in primed state cells with heterogeneous expression pattern. Moreover, primed pluripotent cells express MHC class I antigen, while na state cells do not. Na ESCs carry two active X chromosomes (XaXa) in female cells; in contrast primed EpiSCs have already undergone X chromosome inactivation (Nagy et al. 1990; Thomson et al. 1998; Ying et al. 2003; James et al. 2005; Brons et al. 2007; Tesar et al. 2007; Ying et al. 2008).

These studies proved that extrinsic stimuli are dispensable for the derivation, propagation and pluripotency of ESCs. They also showed that the cells have an innate program for self-replication. Ying et al. demonstrated that LIF and BMP could be dispensed with inducing inhibitors of particular signaling pathways. LIF and small molecule inhibitors of two protein kinases, ERK 1/2 and GSK3 β (termed “2i”) can replace serum by stimulating the WNT pathway. Therefore, 2i allows the maintenance of ESCs in fully defined medium without embryonic feeder cells. The results have been interpreted as the indication that the pluripotent and self-renewing state of ESCs is a “ground state”, that is, a natural default state that need not be actively maintained (Ying et al. 2008).

Taken together, hESCs, EpiSCs and mESCs manifest themselves as potentially distinct cell types and hESCs may be most closely related to the post-implantation human epiblast (Wilmut et al. 2011). The generation of na hESCs will allow creating new opportunities for patient-specific researches. On the other hand, Guo et al. (2009) examined interconversion between mESCs and EpiSCs. They showed that when mESCs exposed to bFGF they could readily become EpiSCs. However,

EpiSCs do not change into ESCs with defined culture environment. Only forced expression of Klf4 in the presence of LIF and BMP could promote the conversion of EpiSCs into ESC-like cells (Guo et al. 2009). Another group, Bao and colleagues (2009) showed the reprogramming of advanced epiblast cells from embryonic day 5.5–7.5 mouse embryos to ESC-like cells in response to LIF-STAT3 signaling. The authors also reported that those reprogrammed ESCs could contribute to somatic tissues and germ cells in chimaeras unlike EpiSCs (Bao et al. 2009). Taken together, it is obvious that modulation of signaling by environmental changes are sufficient to interconvert these closely related cell types indicating that extrinsic growth factors could be dispensable for sustaining the pluripotent state (Ying et al. 2008). Moreover, Hanna et al. (2010a) converted ESCs into a more immature state with an active X-chromosome (XaXa) by ectopic induction of Oct4, Klf4 and Klf2, combined with LIF, GSK3 β inhibitor and MEK inhibitor (Hanna et al. 2010a). These converted hESCs have similar growth properties, gene expression profiles and signaling pathway dependence with mESCs. Intriguingly enough, the recent establishment of preimplantation-derived EpiSCs cultured in human ESCs culture conditions supports this idea (Najm et al. 2011). It was also shown that hESCs with two active X chromosomes (XaXa) could be generated under hypoxic (5% oxygen) conditions (Lengner et al. 2010).

While the na and primed pluripotent states are inconvertible into each other and can be stabilized by appropriate culture conditions, these states have not been observed to coexist stably in the same culture conditions in both mouse and humans. However, it has been proposed that specific extrinsic and intrinsic factors can induce transitions between the states. Although the na state captured by Hanna et al. could be maintained only for limited passages, this study giving clear ideas about growth conditions should be improved in order to resume na ground state in genetically unmodified human cells (Hanna et al. 2010b).

Considerable research effort has been exerted to dissect the molecular functions of core pluripotency factors in the maintenance of pluripotency and establishment of a molecular association among pluripotent cell types. As already mentioned, since there has been important progress in dissecting culture-mediated signaling pathways; now the time is ripe to understand how signaling can be integrated to the transcriptional network.

2.2.1 Transcriptional Network of Pluripotency

ESCs have been investigated by very large-scale genomics and protein-DNA interaction studies to mechanistic studies of individual transcription factors. In addition to signaling requirements, particular transcription factors play major roles in establishing and maintaining pluripotency.

The most critical transcription factors of pluripotent state in ESCs are Oct4, Sox2 and Nanog and they are called the core transcription factors (Silva and Smith 2008). Transcription factors recognize specific DNA sequences and either activate

or prevent transcription. They bind both to promoter-proximal DNA elements and to more distal regions (Young 2011).

Initial specification of pluripotent cells in vivo requires Oct4 expression (Nichols et al. 1998). While losing Oct4 expression leads to trophoctoderm differentiation, higher levels induce differentiation to mesoderm and endoderm (Niwa et al. 2000). Oct4 functions by forming heterodimer with Sox2 in ESCs. Sox2 binds to DNA sequences adjacent to the Oct4 binding sites (Avilion et al. 2003; Chambers and Tomlinson 2009). Sox2 is required for epiblast maintenance. Nanog, on the other hand, promotes a stable undifferentiated ESC state and it is needed for pluripotency to develop in ICM cells (Silva and Smith 2008). ESCs deficient in Nanog genes are more prone to differentiate but do not lose pluripotency per se. Nanog is essential for pluripotent cell specification during normal development and induction of pluripotency to finalize somatic cell reprogramming during induction of pluripotency (Theunissen and Silva 2011). Theunissen and Silva proposed that Nanog acts as a molecular switch to turn on the pluripotent program in mammalian cells (Theunissen and Silva 2011).

Young has also suggested recently that there are two dominated concepts for our understanding of the core transcription factors in control of ESC state (Young 2011):

- (1) The core transcription factors function together to positively regulate their own promoters, forming an interconnected autoregulatory loop.
- (2) The core factors co-occupy and activate expression of genes necessary to maintain ESC state, while contributing to repression of genes encoding lineage-specific transcription factors whose absence helps prevent exit from the pluripotent state.

This interconnected autoregulatory loop could generate a bistable state for ESC: when the factors are expressed at appropriate levels positive-feedback-controlled gene expression program takes action. Alternatively, when any one of the core transcription factors is unavailable, functional differentiation program is activated (Young 2011).

In recent years, there have been considerable efforts to understand pluripotency in a genome-wide manner as well as on a systems level to provide a global understanding of the ground state of ESC state and differentiation. Thus, the discovery of reprogramming of somatic mammalian cells into pluripotent state by overexpression of only four transcription factors had a tremendous effect in understanding the basic cell biology.

References

- Avilion AA et al (2003) Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* 17(1):126–140
- Bao S et al (2009) Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* 461(7268):1292–1295

- Brons IG et al (2007) Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448(7150):191–195
- Chambers I, Tomlinson SR (2009) The transcriptional foundation of pluripotency. *Development* 136(14):2311–2322
- Chou YF et al (2008) The growth factor environment defines distinct pluripotent ground states in novel blastocyst-derived stem cells. *Cell* 135(3):449–461
- Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292(5819):154–156
- Guan K et al (2006) Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 440(7088):1199–1203
- Guo G et al (2009) Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* 136(7):1063–1069
- Hanna J et al (2010a) Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(20):9222–9227
- Hanna J et al (2010b) Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(20):9222–9227
- James D et al (2005) TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 132(6):1273–1282
- Kanatsu-Shinohara M et al (2004) Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119(7):1001–1012
- Lengner CJ et al (2010) Derivation of pre-X inactivation human embryonic stem cells under physiological oxygen concentrations. *Cell* 141(5):872–883
- Matsui Y et al (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70(5):841–847
- Meissner A et al (2008) Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* 454(7205):766–770
- Nagy A et al (1990) Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 110(3):815–821
- Najm FJ et al (2011) Isolation of epiblast stem cells from preimplantation mouse embryos. *Cell Stem Cell* 8(3):318–325
- Nichols J, Smith A (2009) Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4(6):487–492
- Nichols J et al (1998) Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95(3):379–391
- Niwa H et al (2000) Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24(4):372–376
- Santos F et al (2002) Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol* 241(1):172–182
- Silva J, Smith A (2008) Capturing pluripotency. *Cell* 132(4):532–536
- Surani MA (1999) Reprogramming a somatic nucleus by trans-modification activity in germ cells. *Semin Cell Dev Biol* 10(3):273–277
- Tesar PJ et al (2007) New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448(7150):196–199
- Theuvsissen TW, Silva JC (2011) Switching on pluripotency: a perspective on the biological requirement of Nanog. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2222–2229
- Thomson JA et al (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145–1147
- Wilmut I et al (2011) The evolving biology of cell reprogramming. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2183–2197
- Ying QL et al (2003) BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115(3):281–292
- Ying QL et al (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453(7194):519–523
- Young RA (2011) Control of the embryonic stem cell state. *Cell* 144(6):940–954

Chapter 3

Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)

3.1 Generation the First iPSCs

Takahashi and Yamanaka (2006) showed that overexpression of defined transcription factors can also convert cells (or nuclei) to pluripotent state. The idea was the factors that maintain pluripotency in ESCs might induce pluripotency in somatic cells. They tested 24 transcription factors on the basis of their important roles in mESCs. They introduced combinations of those genes into mouse fibroblasts through retroviral transduction. The cells were carrying an antibiotic-resistance gene that would only be expressed when F-box protein 15 gene (Fbxo15) was turned on. They designed this experiment so that this antibiotic-resistance gene could also be turned on if pluripotency was induced by the combination of 24 candidate genes. Surprisingly they found that only four of these factors were sufficient to generate ESC-like colonies. The combination of genes was octamer 3/4 (Oct4, also known as Pou5f1), SRY box-containing gene 2 (Sox2), Kruppel-like factor 4 (Klf4) and c-Myc (later called OKSM). These reprogrammed cells were called as induced pluripotent stem cells (iPSCs) (Takahashi and Yamanaka 2006).

Although the cells that were selected by their ability to express Fbxo15 had similarities to ESCs in morphology, growth properties, expression of important ESC marker genes such as SSEA-1 and Nanog and the ability to form teratomas in immunodeficient mice, they also differed in terms of global gene expression profiles and certain DNA methylation patterns. They failed to produce adult chimeric mice when injected into early mouse embryos. These characteristics indicated that these “first generation” iPSCs were not fully programmed (Yamanaka 2009a, b). Soon after, with the improved end points for the reprogramming process such as using Nanog or Oct4 as selector, instead of Fbxo15, they generated colonies with reactivated pluripotency genes, and these cells were also similar to ESCs and could contribute to adult chimeras (Okita et al. 2007). After one year, human fibroblasts were also reprogrammed with same transcription-factor genes (Takahashi et al. 2007; Wernig et al. 2007; Yu et al. 2007).

Subsequently, several groups independently replicated the reprogramming of human fetal, neonatal and adult somatic cells into iPSCs (Aasen et al. 2008; Lowry et al. 2008; Park et al. 2008a, b). As an indication that transcriptional pathways of pluripotency have been well conserved during evolution, iPSCs have been generated from several species including human, rhesus monkey and murines (Takahashi et al. 2007; Liu et al. 2008; Li et al. 2009). More recently, iPSC lines were shown to generate “all iPSC” mice upon injection into tetraploid blastocysts (Boland et al. 2009; Kang et al. 2009; Zhao et al. 2009).

3.2 Reprogramming

3.2.1 Factor Delivery into Target Cells

iPSCs offer disease and patient-specific cells with the knowledge of the clinical history of the donor and they can be made with cells taken from all ages and conditions such as chronic disease in elder patients. The techniques used to generate iPSCs can affect the efficiency of reprogramming and the quality of resultant iPSCs. Reprogramming methods can be divided into several classes according to their mode of integration of exogenous genetic material into the host genome or those of non-integrative approaches (Stadtfield and Hochedlinger 2010).

3.2.1.1 Integrating Approaches

Retroviruses

The delivery of Yamanaka factors (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, OKSM) into mouse or human fibroblasts was originally achieved using Moloney murine leukemia virus (MMLV)-derived retroviruses. They stably integrated into the host cell genome (Takahashi and Yamanaka 2006; Okita et al. 2007; Wernig et al. 2007). The efficiency of iPSC generation using MMLV-derived retroviruses is ~0.1% in mouse embryonic fibroblasts and ~0.01% in human fibroblasts (Gonzalez et al. 2011). Silencing is important in order to obtain bona fide iPSCs. Only an iPSC that has upregulated the endogenous pluripotency gene network and downregulated the expression of transgenes can really be considered to be fully reprogrammed (Gonzalez et al. 2011). However, retrovirally derived iPSCs have numerous transgene integration sites in the host genome. Incomplete transgene silencing compromises the developmental potential of iPSCs (Brambrink et al. 2008). In addition, residual transgene expression or later reactivation of exogenously applied transcription factors could cause tumor formation at an alarming rate (Okita et al. 2007; Miura et al. 2009).

Lentiviruses

Having higher cloning capacities and infection efficiency than MMLV-based retroviruses, lentiviral delivery vectors have also been used to express reprogramming factors (Blelloch et al. 2007; Yu et al. 2007). As an advantage, they could infect both dividing and non-dividing cells. Although the efficiency of reprogramming is comparable to that of MMLV-derived retroviruses, lentiviruses are less effectively silenced in iPSCs that they generated (Yao et al. 2004). Constitutive lentiviral vectors could not solve the problem because they were even less efficiently repressed and caused a differentiation block (Blelloch et al. 2007; Yu et al. 2007).

Inducible lentivirus systems do not rely on direct factor delivery into target delivery. “Secondary” reprogramming systems use “primary” iPSC clones, generated with doxycycline (Dox)-inducible lentiviral vectors or transposons. Those primary iPSCs then differentiate into genetically homogenous somatic cells using either in vitro differentiation for human cells or blastocyst injection for mice (Maherali et al. 2008; Wernig et al. 2008). Since the primary cells are induced by a lentivirus-contained transcription factors expression cassette under the control of the Dox-inducible operator, “secondary” iPSCs formation are triggered when they are cultured in doxycycline-containing media (Maherali et al. 2008; Wernig et al. 2008). Although the efficiency of the system depends on the target cell type used, it is generally higher than that of primary infection (Stadtfield and Hochedlinger 2010). Stadtfield and Hochedlinger (2010) also reported that secondary systems have two main advantages: reprogramming of large quantities of genetically homogeneous cells, especially the one that is difficult to culture or transduce; and facilitating the comparison of genetically matched iPSCs derived from different somatic cells. However, there is still a disadvantage, which is heterogeneous expression patterns in secondary cell because of lentiviral transgenes that cause cumbersome screening of primary iPSC clones (Stadtfield and Hochedlinger 2010). “Reprogrammable” mouse strains that may carry desired mutant backgrounds might have a striking effect for mechanistic studies of disease pathologies (Carey et al. 2010; Stadtfield et al. 2010).

Single vector. Lentiviral or retroviral vectors designed to express polycistronic cassettes encoding all OKSM factors were more efficient than single factor expressing vectors in infecting different somatic cell types (Carey et al. 2009). Although this method minimizes the genomic integration, there is still tumorigenic risk after implantation. In particular *c-Myc* is a well-known oncogene and its reactivation could give rise to transgene-derived tumor formation in chimeric mice (Okita et al. 2007). Although removal of the *c-Myc* transgene from the reprogramming cocktail reduced the efficiency slightly, the chimeric mice produced with *c-Myc*-free iPSCs did not cause enhanced tumor formation (Nakagawa et al. 2008). However, the overexpression of *Oct4* and *Klf4* can still cause tumor formation and the retroviral insertion may disturb host gene structure and increase the tumor risk (Okita and Yamanaka 2010).

Standard DNA transfection techniques such as using liposomes or electroporation could be good alternatives to avoid the use of viral vectors. However, transduction efficiency is much lower than to that of viral transfections (Gonzalez et al. 2011).

3.2.1.2 Excisable Approaches

A virus-free method utilizing oriP/EBNA1 (Epstein–Barr nuclear antigen-1)-based episomal vectors or a piggyBac (PB)-based single vector reprogramming system has been used successfully for reprogramming human fibroblasts (Kaji et al. 2009; Yu et al. 2009). Another excisable method uses lentiviral vectors and Cre/loxP excisable linear transgenes that leave a genomic scar after Cre deletion. When polycistronic vectors were used, this approach produced the efficient generation of iPSCs from different cell types (Chang et al. 2009). Among integrative methodologies, although only PB system guarantees a precise deletion, it still needs verification of excised lines (Park et al. 2008b).

While the use of Cre-deletable or inducible lentiviruses has solved some problems, viral systems still lack the safety required for therapeutic applications.

3.2.1.3 Non-integrative Approaches

To minimize the risk of chromosomal disruptions, reprogramming protocols refined to eliminate genetic integration. For this purpose, three different approaches have been developed. First one utilizes the use of integrating vectors that can be subsequently removed from the genome as we have already discussed. Second one is using integration-free vectors and the last one is not to use nucleic acid-based vectors (Stadtfield and Hochedlinger 2010). Unfortunately all of them are usually inefficient and poorly reproducible. (Gonzalez et al. 2011).

Among the methods that promote reprogramming without integration are adenoviral vectors that mediate transient expression of the exogenous reprogramming factors without genomic integration. One of the first attempts to generate integration-free iPSCs from adult mouse hepatocytes was reported by Stadtfield et al. (2008), who used non-integrative adenoviral vectors. Using similar vectors Okita et al. (2008) and Zhou and Freed (2009) generated integration-free iPSCs lines from mouse embryonic fibroblasts and human fetal fibroblasts, respectively. Since there is no genomic integration with those systems, it is a proof of principle that transient expression of reprogramming factors is enough for generation of iPSCs from somatic cells (Stadtfield and Hochedlinger 2010). Moreover firm support to conclusion came from recent experiments showing the absence of common integration sites in iPSCs produced with retroviruses or lentiviruses (Varas et al. 2009; Winkler et al. 2010). More recently iPSCs from human fibroblasts were successfully derived utilizing Sendai viral gene delivery systems

(Fusaki et al. 2009), as well as polycistronic minicircle vectors (Jia et al. 2010) and self-replicating selectable episomes (Yu et al. 2009).

DNA-Free Methods

In order to completely eliminate plasmid or viral vectors, more recently iPSCs have been generated by introducing four reprogramming factors in the form of purified recombinant proteins (Zhou et al. 2009; Kim et al. 2009a). However, its efficiency is extremely low, possibly due to low transduction efficiency and unstable expression (Okita and Yamanaka 2010). More recently Warren et al. (2010) showed more efficient reprogramming by using synthetic modified mRNA, which does not modify the genome. The iPSCs formed are called RNA-induced pluripotent cells (iPSCs). Although the protocol is technically very complex, since this technology is RNA based, it completely eliminates the risk of genomic integration and insertional mutagenesis inherent to all DNA-based methodologies. This technology has the highest efficiency and kinetics to date (Walia et al. 2011).

Although the methods, which use non-integrating vectors, excisable genetic elements, small chemicals and/or proteins, leave no genetic footprint, the efficiency of iPSC generation with them ranges between 0.0001 and 0.0018%, which is approximately three orders of magnitude lower than those achieved by integrating vectors (0.1–1%) (Stadtfield and Hochedlinger 2010). Therefore, reprogramming efficiencies have been trying to enhance with supplementing defined factors by additional genes or small chemicals (Masip et al. 2010).

3.2.1.4 Chemical Reprogramming

Small molecules are naturally occurring substances or entirely man-made compounds. They have been produced and screened for activity in diverse organisms, cell culture systems and molecular pathways. Their ease of use, specific, dose-dependent, rapid and reversible effects and precise temporal and functional control in vivo made them one of the most effective tools in biomedical research (Efe and Ding 2011). They have been using lately to facilitate somatic cell reprogramming. Efe and Ding (2011) explained how small molecules improve reprogramming: some has a global effect on cellular plasticity, whereas the others can modulate a specific signaling pathway to replace one or more reprogramming factors. On the other hand, there are also some compounds that work in both categories (Efe and Ding 2011). Omitting oncogenes (Klf4 and cMyc) (Nakagawa et al. 2008; Utikal et al. 2009; Kim et al. 2009b) or replacing one or two transcription factors with small chemicals such as VPA (a histone deacetylase inhibitor) (Huangfu et al. 2008) not only offer a safer clinical potential but also significantly enhance the efficiency of deriving iPS cells. More strikingly, Mali et al. (2010) have shown that low levels of butyrate (a HDAC inhibitor) improved reprogramming efficiency as much as 50-fold. Moreover, Lin et al. (2009) reported that combined treatment of fibroblasts with the Alk5 inhibitor SB431542, the MEK inhibitor PD0325901 and

miRazovivin caused a great improvement (more than 200-fold) in OKSM reprogramming efficiency. (Lin et al. 2009)

3.2.1.5 MicroRNAs (miRNAs) in Reprogramming

miRNAs are 22 nt non-coding small RNAs that regulate expression of downstream targets by messenger RNA (mRNA) destabilization and translational inhibition (Subramanyam and Blelloch 2011). They are loaded into RNA-induced silencing complex (RISC) to exert a global gene-silencing function (Chu and Rana 2007). Multiple miRNAs are often found in clusters in the genome and expressed in a cell type-specific manner, similar to transcription factors. Since a single miRNA can target hundreds of mRNAs, the expression of single miRNA could regulate the cell fate decision powerfully (Sridharan and Plath 2011). Similar to small compounds, miRNAs are also shown that they are able to influence the efficiency of reprogramming. Anokye-Danso et al. (2011) have recently reported that lentivirally delivered miR-302 cluster, which includes miRs-302a-d and miR-367 alone can produce mouse and human iPSCs from fibroblasts. In addition Miyoshi et al. (2011) reprogrammed mouse and human adipose stromal cells by repeatedly transfecting a cocktail of seven miRNAs belonging the miR-302, miR-200 and miR-369 families. However, compared to the viral delivery of miRNA precursors in the study of Anokye and colleagues, the efficiency of reprogramming in latter research was considerably low. It has been suggested that in addition to their popular activities in reprogramming processes, screening cell type-specific miRNAs for transdifferentiation activities might also be very useful to modulate lineage conversion events (Sridharan and Plath 2011).

There are many alternative techniques for reprogramming. For example, Zhong et al. (2011) tested two apoptosis-inducing genes called “inducible suicide genes” or simply “suicide genes” to see if they are available for a potential method of safeguarding iPS cells. They evaluated the cell death-switch capacity of two suicide gene/drug systems, *YCD/5-FC* and *iCaspase/AP20187*, in non-human primate (*Macaca nemestrina*) iPS cells both in vitro and in vivo. The results of the study showed that a suicide gene/prodrug combination could safeguard iPSCs to overcome potential oncogenic transformation and/or persistence of pluripotent cells in iPSC-related cellular therapy (Zhong et al. 2011).

Yamanaka's team reported recently a non-integrative method using p53 suppression and non-transforming L-Myc with episomal plasmid vectors for reprogramming HLA-homozygous iPSCs. They used dental pulp cell lines from two putative human leukocyte antigen (HLA)-homozygous donors who match ~20% of the Japanese population at major HLA loci. As shown in this study dental pulp cells offer important safe sources for allografts, especially for cases in which transplants is likely to be needed soon after injury (Okita et al. 2011, Yildirim et al. 2011).

References

- Aasen T et al (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26(11):1276–1284
- Anokye-Danso F et al (2011) Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 8(4):376–388
- Blelloch R et al (2007) Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell* 1(3):245–247
- Boland MJ et al (2009) Adult mice generated from induced pluripotent stem cells. *Nature* 461(7260):91–94
- Brambrink T et al (2008) Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2(2):151–159
- Carey BW et al (2009) Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(1):157–162
- Carey BW et al (2010) Single-gene transgenic mouse strains for reprogramming adult somatic cells. *Nat Methods* 7(1):56–59
- Chang CW et al (2009) Polycistronic lentiviral vector for “hit and run” reprogramming of adult skin fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27(5):1042–1049
- Chu CY, Rana TM (2007) Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol* 213(2):412–419
- Efe JA, Ding S (2011) The evolving biology of small molecules: controlling cell fate and identity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2208–2221
- Fusaki N et al (2009) Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85(8):348–362
- Gonzalez F et al (2011) Methods for making induced pluripotent stem cells: reprogramming a la carte. *Nat Rev Genet* 12(4):231–242
- Huangfu D et al (2008) Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26(11):1269–1275
- Jia F et al (2010) A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 7(3):197–199
- Kaji K et al (2009) Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458(7239):771–775
- Kang L et al (2009) iPS cells can support full-term development of tetraploid blastocyst-complemented embryos. *Cell Stem Cell* 5(2):135–138
- Kim D et al (2009a) Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4(6):472–476
- Kim JB et al (2009b) Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461(7264):649–653
- Li W et al (2009) Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 4(1):16–19
- Lin T et al (2009) A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nat Methods* 6(11):805–808
- Liu H et al (2008) Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell* 3(6):587–590
- Lowry WE et al (2008) Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(8):2883–2888
- Maherali N et al (2008) A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3(3):340–345
- Mali P et al (2010) Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes. *Stem Cells* 28(4):713–720

- Masip M et al (2010) Reprogramming with defined factors: from induced pluripotency to induced transdifferentiation. *Mol Hum Reprod* 16(11):856–868
- Miura K et al (2009) Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol* 27(8):743–745
- Miyoshi N et al (2011) Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* 8(6):633–638
- Nakagawa M et al (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26(1):101–106
- Okita K, Yamanaka S (2010) Induction of pluripotency by defined factors. *Exp Cell Res* 316(16):2565–2570
- Okita K et al (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448(7151):313–317
- Okita K et al (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322(5903):949–953
- Okita K et al (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8(5):409–412
- Park IH et al (2008a) Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors. *Nature* 451(7175):141–146
- Park IH et al (2008b) Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134(5):877–886
- Sridharan R, Plath K (2011) Small RNAs loom large during reprogramming. *Cell Stem Cell* 8(6):599–601
- Stadtfeld M, Hochedlinger K (2010) Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 24(20):2239–2263
- Stadtfeld M et al (2008) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322(5903):945–949
- Stadtfeld M et al (2010) A reprogrammable mouse strain from gene-targeted embryonic stem cells. *Nat Methods* 7(1):53–55
- Subramanyam D, Blelloch R (2011) From microRNAs to targets: pathway discovery in cell fate transitions. *Curr Opin Genet Dev* 21(4):498–503
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663–676
- Takahashi K et al (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861–872
- Utikal J et al (2009) Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci* 122(Pt 19):3502–3510
- Varas F et al (2009) Fibroblast-derived induced pluripotent stem cells show no common retroviral vector insertions. *Stem Cells* 27(2):300–306
- Warren L 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
- Walia B et al (2011) Induced pluripotent stem cells: fundamentals and applications of the reprogramming process and its ramifications on regenerative medicine. *Stem Cell Rev* Jun 14. [Epub ahead of print]
- Wernig M et al (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448(7151):318–324
- Wernig M et al (2008) A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol* 26(8):916–924
- Winkler T et al (2010) No evidence for clonal selection due to lentiviral integration sites in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 28(4):687–694
- Yamanaka S (2009a) Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 460(7251):49–52
- Yamanaka S (2009b) A fresh look at iPS cells. *Cell* 137(1):13–17
- Yao S et al (2004) Retrovirus silencing, variegation, extinction, and memory are controlled by a dynamic interplay of multiple epigenetic modifications. *Mol Ther* 10(1):27–36

- Yildirim S et al (2011) Tooth regeneration: a revolution in stomatology and evolution in regenerative medicine. *Int J Oral Sci* 3(3):107–116
- Yu J et al (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318(5858):1917–1920
- Yu J et al (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324(5928):797–801
- Zhao XY et al (2009) iPS cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature* 461(7260):86–90
- Zhong B et al (2011) Safeguarding Nonhuman Primate iPS Cells With Suicide Genes. *Mol Ther* 19(9):1667–1675
- Zhou W, Freed CR (2009) Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27(11):2667–2674
- Zhou H et al (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4(5):381–384

Chapter 4

Molecular Mechanisms of Pluripotency

4.1 Steps in Reprogramming

Combined with live imaging analysis, various tetracycline-inducible expression systems for the reprogramming factors are now allowing the probing to mechanistic insights of reprogramming. It is now being suggested that successful reprogramming requires stepwise transition through key intermediate steps (Papp and Plath 2011; Plath and Lowry 2011; Walia et al. 2011).

4.1.1 Increase in the Cell Cycle Rate

A high-resolution time-lapse imaging approach enabled to track that the first characterized event during reprogramming of fibroblasts is the increase of cell division rate (Smith et al. 2010). It indicated that certain cellular processes or events prime the cell before the exogenous transgenes reach to the genome to induce pluripotency (Jopling et al. 2011). Moreover, it has been shown that suppression of apoptosis and senescence is also helpful for successful reprogramming. Specifically, the silencing of p53 and p21 or CDKN2A have been observed upon reprogramming (Kawamura et al. 2009; Marion et al. 2009). Hence, apoptosis, senescence and cell cycle arrest are thought to be barriers for reprogramming (Papp and Plath 2011). However, the study used single cell analysis showed that although proliferation is induced in more cells than in the control sample, most of the p53-depleted cells undermine the reprogramming path later. And the resultant efficiency of the reprogramming was very low when normalized to the number of cells that initially responded (Smith et al. 2010).

The considerable variation between cells in response to induced reprogramming can be shown with the help of a cell sorting experiment for Thy1 (a marker for fibroblast phenotype). In the study by Stadtfeld et al. (2008b) it has been shown that, although almost half of the cell had lost Thy1 expression after five days of

treatment, only very small fraction of those cells become fully reprogrammed at the end of the process. However, Hanna et al. (2009) displayed that extended induction of transgene expression could induce most, if not all, cells to iPSCs.

4.1.2 Morphological Changes

Rapid cycling cells get smaller over time and continue to grow as monolayers although most cells expressing the reprogramming factors fail to successfully induce the first morphological change of proper reprogramming events, remain fibroblast like and often undergo apoptosis, senescence and cell cycle arrest (Plath and Lowry 2011).

ESCs and their in vivo counterparts, the epiblast progenitor cells of the pre-implantation blastocyst, are epithelial in nature, therefore they have close cell-cell contacts, high proliferation rate with an extremely short G1 cell cycle phase, and large nucleus to cytoplasm ratio (Papp and Plath 2011). At the initial phases of reprogramming, fast cycling cells cluster tightly and undergo changes that correspond to loss of mesenchymal features and acquisition of epithelial cell characteristics (Li et al. 2010). This is exactly the opposite of the epithelial-mesenchymal transitioning (EMT) of developmental pluripotency to differentiation transition, during reprogramming (Li et al. 2010; Samavarchi-Tehrani et al. 2010). Therefore, signaling pathways known to promote mesenchymal-epithelial transition (MET) should increase the efficiency of reprogramming. Accordingly, it has been shown that inhibition of TGF- β improves reprogramming, because TGF- β activity prevents MET (Li et al. 2010). In addition it has been shown that BMP signaling enhances reprogramming through the up-regulation of pro-MET microRNAs (Samavarchi-Tehrani et al. 2010). Moreover, E-cadherin-mediated cell-cell contacts are required and its knockdown interferes with reprogramming (Chen et al. 2010).

4.1.3 Late Events Toward Pluripotency

The genes that are related to epithelial cell character are activated for pluripotency. While alkaline phosphatase and SSEA-1 are considered as intermediate stage markers, Nanog in the mouse and TRA-1-60 in human cells are final stage markers for pluripotency (Okita et al. 2007; Wernig et al. 2007; Mikkelsen et al. 2008; Stadtfeld et al. 2008b; Chan et al. 2009). It has been postulated that expression of reprogramming factors initiate sequential and fairly synchronous order. Although iPSC state needs continuous expression of the reprogramming factors to overcome roadblocks toward pluripotency, maintenance of iPSCs is independent of factor overexpression (Brambrink et al. 2008; Stadtfeld et al. 2008b; Papp and Plath 2011; Plath and Lowry 2011).

4.2 Mechanisms in Reprogramming

In the process of reprogramming it has been shown that a genome-wide alteration of epigenetic marks, regulation of cell cycle checkpoints and MET are required for the acquisition of pluripotency (Samavarchi-Tehrani et al. 2010; Plath and Lowry 2011). While reprogramming factors reset the cellular phenotype from the inside, it also requires extrinsic signals provided by the ESC culture conditions including growth factors, cytokines and other signals provided by the cell culture medium, fetal bovine serum and feeder cells. How extrinsic signals are integrated with intrinsically acting factors is not entirely clear, and it is an active area of investigation (Ralston and Rossant 2010).

4.2.1 Genetic Factors

The reprogramming of somatic cells required using of genetic factors, namely Oct4, Nanog, Sox2, Klf4, c-Myc and Lin28 (Takahashi and Yamanaka 2006; Yu et al. 2007). It has been shown previously that Nanog, Lin28 and c-Myc can be dispensable for reprogramming (Yu et al. 2007; Nakagawa et al. 2008; Wernig et al. 2008b).

Theunissen and Silva (2011) reported that “Nanog counteracts differentiation but is ultimately dispensable for maintenance of pluripotency in ESCs”. Accordingly, although Nanog was not among the core transcription factors of reprogramming, it is essential to finalize reprogramming. The authors proposed that Nanog acts as a molecular switch to turn on the naïve pluripotent programme in mammalian cells (Theunissen and Silva 2011). Furthermore, it has been shown that Nanog overexpression could accelerate reprogramming in a predominantly cell division rate independent manner (Silva et al. 2006).

Myc, unlike Oct4, Sox2 and Klf4, is not involved in the upregulation of the pluripotency network during the final step of reprogramming. The fact that Myc might enhance but is not absolutely required for the transcription of pluripotency target genes, explains why this factor is dispensable for the reprogramming but still is able to enhance the efficiency and the kinetics of the process (Nakagawa et al. 2008; Wernig et al. 2008b; Plath and Lowry 2011).

Appropriate chemical compounds in culture media may be substituted Sox2 and Klf4. These two factors were also dispensable, when the somatic cells, which have high expression of Sox2 and Klf4 are used for reprogramming (Aoi et al. 2008; Huangfu et al. 2008; Li et al. 2009).

The last element of core transcriptional regulatory circuitry, Oct4, has been shown to be the most important factor in the reprogramming cocktail. It is the only one of the initial four factors, which has been shown to be essential for reprogramming (Walia et al. 2011). However, a recent study has showed that NR5A2, also known as LRH-1 (liver receptor homolog-1), can replace Oct4 with improved reprogramming efficiency (Heng et al. 2010).

It is obvious that the effects of main reprogramming factors are regulated and mediated by other receptors, transcription factors, growth factors, enzymes, other proteins and chemicals (Walia et al. 2011).

4.2.2 Signaling Pathways

4.2.2.1 Wnt Signaling

Some of the components of this evolutionary conserved pathway have been shown to enhance reprogramming activity. A downstream effector of the Wnt pathway, an inhibitor of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) called 6-bromoindirubin-3'-oxime or BIO, has been shown to maintain pluripotency in human and mouse ESCs (Sato et al. 2004). Addition of Wnt3a to culture media enhance reprogramming efficiency (Marson et al. 2008). Another GSK3 inhibitor, CHIR99021 compensates Sox2 absence in hiPSC programming (Li et al. 2009). Giving a big credit to Wnt/ β -catenin signaling pathway mediated activation of transcription, Abu-Remaileh et al. (2010) showed that Oct4 interacts with β -catenin and modulates Wnt signaling to maintain stem cell identity and regulate cell fate decision.

4.2.2.2 TGF- β /Activin/Nodal Signaling

As one of the most studied pathway, TGF- β /Activin/Nodal plays important roles in the maintenance of pluripotent state. FGF and TGF β /Activin signaling promote self-renewal of hESCs. Nanog has been shown as a critical molecule for pluripotency and a direct target of TGF- β /Activin pathway (Xu et al. 2008). By the binding of Smad coactivators to the Nanog proximal promoter, Nanog expression is upregulated (Theunissen and Silva 2011). While inhibition of TGF- β signaling using a TGF- β receptor/Alk5 kinase inhibitor enhances the efficiency of mouse iPSC reprogramming and this inhibitor could replace with Sox2 and c-Myc. However, similar effect was not seen in hiPSCs (Maherali and Hochedlinger 2009). It has been shown that TGF- β signaling inhibition leads mesenchymal transition in hESCs (James et al. 2005).

4.2.2.3 BMP Signaling

BMPs belong to the TGF- β superfamily. They are involved in the regulation of cell proliferation, differentiation and apoptosis and therefore play essential roles during embryonic development and pattern formation (Massague 1998). Xu et al. (2008) showed that both TGF β - and BMP-responsive SMADs can bind with the Nanog proximal promoter causing an enhancement to Nanog promoter activity and this activity is decreased by BMP signaling. Differentiation of hESCs is promoted

by BMP signaling (Xu et al. 2008). Another BMP family member is growth and differentiation factor 3 or GDF3 and it has been shown to block BMP signaling in both hESCs and mESCs (Levine and Brivanlou 2006).

4.2.2.4 p53 Pathway

Several groups reported that p53, one of the well-studied tumor suppressor transcription factors, acts as a barrier to somatic cell reprogramming (Kawamura et al. 2009; Li et al. 2009; Marion et al. 2009; Utikal et al. 2009). Hong et al. (2009) proposed that the p53-p21 pathway serves as a safeguard not only in tumorigenicity, but also in iPS cell generation (Hong et al. 2009). On the other hand, Hanna et al. (2009) showed that most cells are capable of becoming iPSCs without depleting p53 or immortalizing the cells (Hanna et al. 2009). Moreover, monitoring the effect of p53 knockdown at the single cell level showed that most of the p53-depleted cells derail from reprogramming path and lower overall reprogramming efficiency (Smith et al. 2010). It has been suggested that future efforts for more successful reprogramming should select target cells with lower levels of p53 and/or higher proliferative ability, rather than silencing the p53 pathway (Tapia and Scholer 2010). Accordingly, Yamanaka's team has already published a simple and efficient method, using p53 suppression and nontransforming c-Myc to reprogram human somatic cells (Okita et al. 2011).

4.3 Dynamics of Direct Reprogramming

In general, induced pluripotent somatic cell reprogramming is an inefficient process even when different strategies are used. There is a latency of approximately 5–10 days before the first iPSCs appears. This delay and the low efficiency are indicators of stochastic mechanisms involved in inducing reprogramming (Hanna et al. 2009). While low efficiency is a strong barrier for applying human iPSCs to medicine, the stochastic and rate-limiting epigenetic mechanisms show that with a balanced reprogramming factor stoichiometry, nearly every cell is able to generate iPSCs (Hanna et al. 2010b).

Yamanaka (2009a, b) proposed recently that only a few cells in a primary cell culture might be competent for reprogramming. In fact, the retroviral vector can infect over 90% of fibroblasts, however only a small number of iPSC colonies emerged with the efficiency of 0.001%. This low efficiency suggests that the origin of iPSCs may be emerging from very small number of cells from the tissue. The candidates for these cells are adult stem or progenitor cells, as they are rare and developmentally closer to pluripotent cells than differentiated cells. It was also thought that for successful reprogramming, activation of additional genes by insertional mutagenesis might be crucial (Yamanaka 2009a, b). However, this model (called elite model) could not sustain longer, since human and mouse iPSCs

generated from several terminally differentiated somatic cells, including B and T lymphocytes (Hanna et al. 2008; Eminli et al. 2009) as well as pancreatic β cells (Stadtfield et al. 2008a). Furthermore Okita et al. (2008) and Stadtfield et al. (2008a) showed simultaneously that insertional mutagenesis is not an essential step of reprogramming process.

Therefore Yamanaka suggests another theory in stochastic model. In this model he offered most, if not all, differentiated cells have the potential to become iPSCs by four factor introduction (Yamanaka 2009a, b). Likewise, Meissner et al. (2007) showed previously that even morphologically similar iPSC colonies start express Oct4 at different times. These data clearly show reprogramming events are stochastic in nature (Meissner et al. 2007). Besides, in contrast to claim that the differentiation state itself may also influence the susceptibility of cells to form iPSCs (Eminli et al. 2009), there are also reports that demonstrate that iPSCs do not prefer less differentiated cells and controlling in vitro cell plating efficiency, growth expansion and gene delivery methods are critical for this purpose (Hanna et al. 2009).

Although the exact mechanisms are still unknown, reprogramming is a very complex sequence of events requires silencing of the somatic cell program than resetting of the pluripotency programs. Apart from the genetic factors and signaling pathways, epigenetic modulations and regulation clearly play role for breaking the epigenetic barriers then reaching self-renewal and pluripotency.

4.4 Epigenetic Modifications

Epigenetics describes mitotically heritable modifications of DNA or chromatin without altering the nucleotide sequence. DNA methylation, histone modification, histone variants and non-coding RNAs are mechanisms of epigenetic regulation (Bird 2002). A central question in the field of ESCs pluripotency is the extent to which epigenetic marks regulate, rather than simply reflect, the pluripotent state in vitro (Meissner 2010). It has been suggested that ESCs have unique signatures including highly expressed DNA methyltransferases (Dnmt1, 2, 3a, 3b and 3 l) and the core PRC1 and 2 subunits, distinct CpG distribution than somatic cells and ICM and finally different distribution and enrichment of various histone modifications (Meissner 2010). However, their individual regulatory roles are far from our intuitive understanding. Despite significant advances in technology, it is still difficult to describe lineage specification and the associated global epigenetic remodeling for many cell types in vitro. Therefore, it is still fascinating how a somatic cell changes its epigenetic state to pluripotency by repealing the existing epigenetic state without passing through normal development or complete resetting of all marks (Meissner 2010). It has been suggested that somatic cell reprogramming involves massive reconfiguration of chromatin structure, from DNA methylation to histone modifications to nucleosome remodeling (Ang et al. 2011).

Candidates for the epigenetic modifications in de-differentiation process from somatic cells to iPSCs are promoter CpG DNA methylation, and alteration in histone modifications in relation with this importance of PcG mediated repression of genes. Genome-wide approaches show that the pattern of H3K9me3 within promoter regions is different between hESC and hiPSCs (Maherali et al. 2007; Fouse et al. 2008; Doi et al. 2009). The comparison of iPSCs and ESCs has revealed that the conversion of monovalent histone methylation marks such as H3K4me3 or H3K27me3 to bivalent marks in the developmental genes (Bernstein et al. 2006). The loss of DNA methylation along with the reactivation of transcription of pluripotency genes is another important steps in the acquisition of pluripotency. For example, inhibition of DNA methylation with the DNMT inhibitor 5-azacytidine; inhibition of histone deacetylation using the HDAC inhibitors VPA and trichostatin A improve reprogramming efficiency. Moreover, using a K4 demethylase LSD1 inhibitor Parnate (tranylcyprome) and the induction of histone H3K9 hypomethylation using the G9a methyltransferase chemical inhibitor BIX-01294 were successful to increase reprogramming efficiency (Huangfu et al. 2008; Mikkelsen et al. 2008; Shi et al. 2008). Besides, it is logical to think that downregulation of epigenetic factors causes removal of epigenetic barriers preventing reprogramming. Likewise, loss of CHD1 in mouse somatic cells and a transcriptional regulator PRDM14 in human cells results in decreased reprogramming efficiency (Chia et al. 2010).

Two groups have recently showed that the DNA methylation pattern of the original cell persisted in mouse iPSCs and affected their differentiation potential; iPSCs from blood more easily differentiated toward blood lineages than iPSCs derived from fibroblasts (Kim et al. 2010; Polo et al. 2010). Although continued passaging of iPSCs could erase this epigenetic memory (Polo et al. 2010), residual DNA methylation within lineage-specific genes of iPSCs demonstrates that resetting this mark is fundamental to reprogramming (Plath and Lowry 2011). Furthermore, Lister et al. (2011) showed that reprogramming also induced aberrant methylation that seems to be specific to iPSC state.

4.5 Similarities and Differences Between iPSCs and ESCs

The characteristics of somatic cells are limited proliferation, methylation of pluripotency genes, displaying tissue-specific cell morphology, inactivation of X chromosome, active G1 cell cycle checkpoint and expression of somatic cell specific markers. On the other hand, pluripotent cells robustly show self-renewal, ESC morphology, and reactivation of pluripotency genes by demethylation, X-chromosome reactivation in female cells, telomerase activity and finally loss of G1 checkpoint (Cox and Rizzino 2010). Although a number of studies have clearly showed that iPSCs are highly similar to ESCs (Mikkelsen et al. 2008; Okita et al. 2008; Soldner et al. 2009), extensive examination of chromatin state of both has shown that there are consistent and functionally relevant differences (Plath and

Lowry 2011). It has been demonstrated that gene expression signatures of virally programmed iPSCs are distinguished from that of ESCs (Lowry et al. 2008; Maherali et al. 2008; Chin et al. 2009; Soldner et al. 2009). However, human iPSCs generated without viral vectors or genomic insertions still displayed retained potential transcriptional signatures (Marchetto et al. 2010). Wang et al. (2010) compared transcriptomes of fibroblasts, partially reprogrammed iPSCs, ESCs and iPSCs using microarray data. They concluded that most of the reprogrammed iPSC lines were similar to ESC lines. Especially, the transcriptomes of the iPSCs derived by episomal-based non-integrating plasmids (Yu et al. 2009) were much closer to that of ESCs, unlike that of retroviral-derived iPSCs (Lowry et al. 2008; Maherali et al. 2008; Chin et al. 2009; Soldner et al. 2009). Moreover, the extent of overlapping implemented in the microarray platform was determined by showing that ESCs and iPSCs express 2390 common genes, with only 249 and 684 genes expressed exclusively in those cells respectively. In general, iPSCs share more genes in common with the fibroblasts from which they were derived (Wang et al. 2010).

Given that the reprogramming process is expected to remove any epigenetic alterations associated with originated cells from nuclear transfer (NT) and ESCs, which have reported faithfully erased any epigenetic marks present in donor cells (Okita et al. 2007; Maherali et al. 2008; Mikkelsen et al. 2008), the data showing iPSCs share more common genes with their parental fibroblasts was quite surprising. In fact, in 19 July 2010 simultaneously published two papers proved that even rigorously selected early-passage iPSCs could retain epigenetic marks that are characteristic of the donor cell (Kim et al. 2010; Polo et al. 2010). Plath and Lowry (2011) stated that epigenetic memory might be a form of incomplete reprogramming.

Furthermore, Urbach et al. compared hESC lines isolated from an embryo affected by Fragile X syndrome and reprogrammed fibroblasts of affected individuals. They observed that the *FMRI* gene remained silenced in the iPSCs. While those iPSCs showed stringent pluripotency criteria, the *FMRI* locus was obviously resistant to reprogramming (Urbach et al. 2010). This study shows that human ES and iPS cells are not identical, even in some circumstances ESCs may more faithfully reflect the disease process (Unternaehrer and Daley 2011). Moreover, Bock et al. (2011) has used quantification of molecular similarity by a “scorecard” included DNA methylome, transcriptome and differentiation studies and reported that although ESCs exhibit significant variability across individual lines, iPSCs are more variable at the molecular level than ESCs (Lister et al. 2011). Plath and Lowry (2011) interpreted those differences as follows:

These methylation differences between ESCs and iPSCs are associated with differences at the transcriptional level that can be found after many passages and might affect the differentiation behaviour of cells.

Utilizing both “forward” and “reverse” genetic approaches with the aid of iPSCs offer exciting prospects for dissecting molecular mechanisms of commitment and differentiation in a cell lineage and will help to understand rewiring the regulatory networks that are active in somatic and pluripotent cells (Hemberger

et al. 2009; Huang 2009; Saha and Jaenisch 2009). Future work should focus on finding out when and how the lineage-specific genetic and epigenetic marks arise.

References

- Abu-Remaileh M et al (2010) Oct-3/4 regulates stem cell identity and cell fate decisions by modulating Wnt/beta-catenin signalling. *EMBO J* 29(19):3236–3248
- Ang YS et al (2011) Stem cells and reprogramming: breaking the epigenetic barrier? *Trends Pharmacol Sci* 32(7):394–401
- Aoi T et al (2008) Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science* 321(5889):699–702
- Bernstein BE et al (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125(2):315–326
- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16(1):6–21
- Bock C et al (2011) Reference maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* 144(3):439–452
- Brambrink T et al (2008) Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2(2):151–159
- Chan EM et al (2009) Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotechnol* 27(11):1033–1037
- Chen T et al (2010) E-cadherin-mediated cell–cell contact is critical for induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells* 28(8):1315–1325
- Chia N et al. (2010) A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity. *Nature* 468(7321):316–320
- Chin MH et al (2009) Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell* 5(1):111–123
- Cox JL, Rizzino A (2010) Induced pluripotent stem cells: what lies beyond the paradigm shift. *Exp Biol Med (Maywood)* 235(2):148–158
- Doi A et al (2009) Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet* 41(12):1350–1353
- Eminli S et al (2009) Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 41(9):968–976
- Fouse SD et al (2008) Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/Nanog, PcG complex, and histone H3 K4/K27 trimethylation. *Cell Stem Cell* 2(2):160–169
- Hanna J et al (2008) Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133(2):250–284
- Hanna J et al (2009) Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature* 462(7273):595–601
- Hanna JH et al (2010) Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143(4):508–525
- Hemberger M et al (2009) Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(8):526–537
- Heng JC et al (2010) The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell* 6(2):167–174
- Hong H et al (2009) Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* 460(7259):1132–1135
- Huang S (2009) Reprogramming cell fates: reconciling rarity with robustness. *Bioessays* 31(5):546–560

- Huangfu D et al (2008) Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26(11):1269–1275
- James D et al (2005) TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 132(6):1273–1282
- Jopling C et al (2011) Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(2):79–89
- Kawamura T et al (2009) Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460(7259):1140–1144
- Kim K et al (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467(7313):285–290
- Levine AJ, Brivanlou AH (2006) GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos. *Development* 133(2):209–216
- Li W et al (2009) Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 4(1):16–19
- Li R et al (2010) A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 7(1):51–63
- Lister R et al (2011) Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471(7336):68–73
- Lowry WE et al (2008) Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(8):2883–2888
- Maherali N et al (2007) Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1(1): 55–70
- Maherali N, Hochedlinger K (2009) Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Curr Biol* 19(20):1718–1723
- Maherali N et al (2008) A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3(3):340–345
- Marchetto MC et al (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143(4):527–539
- Marion RM et al (2009) A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature* 460(7259):1149–1153
- Marson A et al (2008) Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 3(2):132–135
- Massague J (1998) TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* 67:753–791
- Meissner A et al (2007) Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 25(10):1177–1181
- Meissner A (2010) Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat Biotechnol* 28(10):1079–1088
- Mikkelsen TS et al (2008) Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454(7200):49–55
- Nakagawa M et al (2008) Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26(1):101–106
- Okita K et al (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448(7151):313–317
- Okita K et al (2008) Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322(5903):949–953
- Okita K et al (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8(5):409–412
- Papp B, Plath K (2011) Reprogramming to pluripotency: stepwise resetting of the epigenetic landscape. *Cell Res* 21(3):486–501
- Plath K, Lowry WE (2011) Progress in understanding reprogramming to the induced pluripotent state. *Nat Rev Genet* 12(4):253–265
- Polo JM et al (2010) Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 28(8):848–855
- Ralston A, Rossant J (2010) The genetics of induced pluripotency. *Reproduction* 139(1):35–44

- Saha K, Jaenisch R (2009) Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell* 5(6):584–595
- Samavarchi-Tehrani P et al (2010) Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 7(1):64–77
- Sato N et al (2004) Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10(1):55–63
- Shi Y et al (2008) A combined chemical and genetic approach for the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2(6):525–528
- Silva J et al (2006) Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion. *Nature* 441(7096):997–1001
- Smith ZD et al (2010) Dynamic single-cell imaging of direct reprogramming reveals an early specifying event. *Nat Biotechnol* 28(5):521–526
- Soldner F et al (2009) Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136(5):964–977
- Stadtfield M et al (2008a) Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322(5903):945–949
- Stadtfield M et al (2008b) Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2(3):230–240
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663–676
- Tapia N, Scholer HR (2010) p53 connects tumorigenesis and reprogramming to pluripotency. *J Exp Med* 207(10):2045–2048
- Theunissen TW, Silva JC (2011) Switching on pluripotency: a perspective on the biological requirement of Nanog. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2222–2229
- Unternaehrer JJ, Daley GQ (2011) Induced pluripotent stem cells for modelling human diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2274–2285
- Urbach A et al (2010) Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6(5):407–411
- Utikal J et al (2009) Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci* 122(Pt 19):3502–3510
- Walia B et al (2011) Induced pluripotent stem cells: fundamentals and applications of the reprogramming process and its ramifications on regenerative medicine. *Stem Cell Rev* Jun 14. [Epub ahead of print]
- Wang Y et al (2010) A transcriptional roadmap to the induction of pluripotency in somatic cells. *Stem Cell Rev* 6(2):282–296
- Wernig M et al (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448(7151):318–324
- Wernig M et al (2008) c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2(1):10–12
- Xu RH et al (2008) NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. *Cell Stem Cell* 3(2):196–206
- Yamanaka S (2009a) Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 460(7251):49–52
- Yamanaka S (2009b) A fresh look at iPS cells. *Cell* 137(1):13–17
- Yu J et al (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318(5858):1917–1920
- Yu J et al (2009) Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324(5928):797–801

Chapter 5

Modeling Disease in a Dish

Main idea for therapeutic approaches by iPSCs at the beginning was the fact that patient-specific iPSCs provide important information for inherited human disorders because pluripotent stem cells are capable of differentiation into most, if not all cell types. This idea was deeply relied on the studies of directed differentiation of subtypes and genetically defined ESCs from animal models (Gearhart 1998). Moreover, human ESC biology has been pursuing generating mutant human ESC lines as disease models since Thomson et al. (1998) derived human ESC lines in 1998. With the known disease-associated genetic loci and explicit disease phenotype, genetically modified human ESCs could help to cell replacement therapies and modeling human diseases (Saha and Jaenisch 2009).

However, the use of ESCs has several limitations not only in political, religious, ethical and moral concerns on the destruction of human embryos but also inefficient methods to generate genetically modified human ESCs. For example, human ESC generation via PGD embryos is available for only a limited number of diseases and lack of proper techniques are still challenging. Besides, only a few monogenic diseases could be detectable via PGD and there is no consistency between severity and clinical symptoms of those diseases from patient to patient due to variable penetrance (Colman and Dreesen 2009). Other alternatives such as generating individual pluripotent stem cells by NT, cell fusion with ESCs and treatment with extracts of pluripotent cells are very restrictive for several reasons and still few diseases have been captured by these ways (Wakayama et al. 2001; Taranger et al. 2005).

Animal models for human diseases have been using for decades. However they have also some limitations such as showing no or only an approximate resemblance to the human disease, differences in physiology and anatomy between animals and humans, no mirroring for cognitive or behavioral defects of neurological diseases, and different genetic background of animals and humans in terms of resulting phenotype of disease-associated mutations (Colman and Dreesen 2009; Saha and Jaenisch 2009).

To overcome these drawbacks, iPSCs offer disease and patient-specific cells with the knowledge of the clinical history of the donor and they can be made with

cells taken from all ages even from elderly patients with chronic disease (Dimos et al. 2008). We can summarize advantages of using in modeling human diseases as:

1. Inexhaustible cell source for experimentation,
2. Limitless self-renewing capacity with pluripotent nature,
3. Development of isogenic cell lines,
4. Personalized treatments (Mattis and Svendsen 2011; Unternaehrer and Daley 2011; Zhu et al. 2011).

Although there are still many challenges regarding to their identity, a couple of reports are available so far to overview a disease phenotype in vitro (Ebert et al. 2009; Lee et al. 2009; Raya et al. 2009; Ye et al. 2009b). Since hESC lines display variable outcomes to differentiate into specific lineages (Osafune et al. 2008), multiple iPSC lines generated from a single patient are extremely favorable by having identical genetic background.

5.1 Disease-Specific iPSCs

Disease-specific iPSCs have been generated from individuals with disorders, such as neurodegenerative diseases, including ALS (Dimos et al. 2008), Parkinson's Disease (Park et al. 2008a; Baek et al. 2009; Soldner et al. 2009; Hargus et al. 2010; Swistowski et al. 2010), SMA (Ebert et al. 2009), familial dysautonomia (Lee et al. 2009) and inherited diseases, including adenosine deaminase deficiency-related severe combined immune deficiency (ADA-SCID), Shwachman-Bodian-Diamond syndrome (SBDS), Gaucher disease (GD) type III, Duchenne (DMD) and Becker muscular dystrophy (BMD), Huntington's disease, juvenile-onset, type 1 diabetes mellitus (JDM), Down syndrome (DS)/trisomy 21, the carrier state of Lesch-Nyhan syndrome (Park et al. 2008b) and Fanconi anaemia (Raya et al. 2009). Unternaehrer and Daley (2011) have reported existing disease-specific iPSC lines available so far from neurological, hematological, cardiovascular and other categories (Table 5.1).

5.2 Choosing Cell Sources

In order to generate patient-specific iPSCs, the first step will be derivation of iPSCs from somatic cells of patient. iPSCs can be made with cells taken from patients of all ages with full medical records, more than 5,000 known genetic diseases, whether simple or complex (Colman and Dreesen 2009). There are available human tissues with no ethical or surgical concern, such as fat, blood, biopsy specimens, skin, plugged hair and extracted tooth (Aasen et al. 2008; Sun

Table 5.1 Disease-specific cell lines from Unternaehrer and Daley (2011)

Disease	Reference	Molecular defect	Donor cell	Age, sex of donor	Method	Differentiated to	Disease phenocopied in	Disease phenocopied in differentiated cells	Drug or functional tests
<i>Neurological</i>									
ALS	(Dimos et al. 2008)	Superoxide dismutase L144F dominant allele	Dermal fibroblasts	82, 89 F	RV4	Motor neurons (HB9 +, ISLET1/2 +, ChAT +)	n.a.	n.d.	No
SMA	(Ebert et al. 2009)	Uncharacterized; decreased SMN1 expression	Fibroblast	3 M	LVOSLN	Neurons and astrocytes, mature motor neurons	n.a.	Yes; reduced size and number of motor neurons, defective synapse formation, with culture	VPA and tobramycin increased total SMN1 protein and gem formation
Parkinson disease	(Park et al. 2008a; Baek et al. 2009; Soldner et al. 2009; Hargus et al. 2010; Swistowski et al. 2010)	Unknown, <i>LRRK2</i> , undefined	Dermal fibroblast	71, 53, 53, 57, 60, 60, 85, M, F	RV4, LV3, 4, iLV, eLV; some factor free; xRV4	Dopaminergic neurons	n.a.	No	Transplant into brains of rats with Parkinson model; rescue of one of three measures of disease
Huntington disease	(Park et al. 2008a)	72 CAG repeats, huntingtin gene	Fibroblast	20 F	RV4	None	n.a.	n.d.	No
Down syndrome	(Park et al. 2008a; Baek et al. 2009)	Trisomy 21	Fibroblast	1 M	RV4	Teratoma	Yes	Yes; reduced microvessel density	No
Fragile X syndrome	(Urbach et al. 2010)	CGG triplet repeat expansion resulting in silencing of <i>FMR1</i>	Dermal fibroblast (2 lines), foetal lung fibroblasts (1 line)	4, 29 y/o, 22 week M	RV4	None	Yes; FMR1 silenced	n.d.	No
Familial dysautonomia	(Lee et al. 2009)	Partial skipping of exon 20 of <i>IKBKAP</i> , reduced IKAP protein	Dermal fibroblast	10 F	LV4	Central NS, peripheral NS, haematopoietic, endothelial, endodermal	Higher ratio normal; mutant transcripts in iPS than fibroblast	Yes; decreased expression of genes involved in neurogenesis and neuronal differentiation	decreased migration in wound healing assay; kinetin reduced mutant splice form, and increased per cent of differentiating neurons; no improvement in migration

(continued)

Table 5.1 (continued)

Disease	Reference	Molecular defect	Donor cell	Age, sex of donor	Method	Differentiated to	Disease phenocopied in	Disease phenocopied in differentiated cells	Drug or functional tests
Rett syndrome	(Hotta et al. 2009; Marchetto et al. 2010)	Heterozygous mutation in <i>MCP2</i> : C916T, 1155del32, C730T, C473T	Fibroblast	3, 5, 8 F	LV4 EOS, RV4	None, neural progenitor cells	n.d., no	n.d., yes; reduced number of spines and density of glutamatergic synapse formation	Yes; IGFI, high doses gentamicin treatment led to more glutamatergic synapses; decreased frequency/intensity of spontaneous currents
<i>Haematological</i> ADA-SCID	(Park et al. 2008a)	GGG, AGG, exon 7 and Del(GAAGA) exon 10, <i>ADA</i> gene FA-A, FA-D2 corrected	Fibroblast	3 M	RV4	None	n.a.	n.d.	No
Fanconi anaemia	(Raya et al. 2009)	FA-A, FA-D2 corrected	Dermal fibroblasts	Unknown M	RV4, 2 rounds with 2i	Hematopoietic	No (corrected)	No (corrected)	No
Schwachman-Bodian-Diamond syndrome	(Park et al. 2008a)	Multi-factorial	Bone marrow mesenchymal cells	4 M	RV4	None	n.a.	n.d.	No
Sickle cell anemia	(Malik et al. 2008; Somers et al. 2010)	Undefined? SS	Fibroblast	20 foetal week F	1eLV4; eLV4 + T	None	n.d.	n.d.	No
Beta thalassaemia	(Ye et al. 2009a)	Homozygous for codon 41/42 4-bp (CTTT) deletion in beta-globin	Dermal fibroblast	Unknown	RV4	Hematopoietic	n.a.	n.d.	No
Polycythemia vera	(Ye et al. 2009b)	Heterozygous <i>JAK2</i> 1849G, T	Fibroblast	Unknown	RV4	Hematopoietic	n.a.	Yes; enhanced erythropoiesis	No
Primary myelofibrosis	(Ye et al. 2009b)	Heterozygous <i>JAK2</i> 1849G, T	Fibroblast	Unknown	RV4	None	n.d.	n.d.	No
<i>Metabolic</i> fibroblastosis	(Park et al. 2008a; Soldner et al. 2009; Khan et al. 2010)	Heterozygosity of <i>HPR1</i> ; A. G mutation in exon 3 of <i>HPR1</i>	Fibroblast	34, 11 F	ILV4 + N, iLV3; AAV	None	n.a.	n.d.	No

(continued)

Table 5.1 (continued)

Disease	Reference	Molecular defect	Donor cell	Age, sex of donor	Method	Differentiated to	Disease phenocopied in	Disease phenocopied in differentiated cells	Drug or functional tests
Diabetes type I	(Park et al. 2008a; Machr et al. 2009)	Multi-factorial; unknown	Fibroblast	42, 32, 30 F, M	RV3,4	Beta-like cells: somatostatin, glucagon, insulin +, glucoseresponsive	n.a.	n.d.	No
Gaucher disease type III	(Park et al. 2008a)	AAC > AGC, exon 9, Ginsertion, nucleotide 84 of cDNA, <i>GBA</i> gene	Fibroblast	20 M	RV4	None	n.a.	n.d.	No
AIATD	(Rashid et al. 2010; Somers et al. 2010)	A1-antitrypsin deficiency: G342 K	Dermal or liver fibroblasts	65, 55, 47, 57, 61, 64, 0.3 yr F, M	RV4, 1eLV4	Hepatocyte-like cells (fetal)	n.d.	Yes; polymer accumulation	No
GSD1a	(Ghodsizadeh et al. 2010; Rashid et al. 2010)	Hepatic glucose-6-phosphate deficiency	Dermal fibroblasts	25, 7 M	RV4	Hepatocyte-like cells (fetal)	n.d.	Yes; hyper-accumulation of glycogen	No
FH	(Rashid et al. 2010)	Familial hypercholesterolemia, autosomal dominant LDLR mutation	Fibroblast	NK	RV4	Hepatocyte-like cells (fetal)	n.d.	Yes; impaired LDL incorporation	No
Crigler-Najjar syndrome	(Ghodsizadeh et al. 2010; Rashid et al. 2010)	13 bp deletion, exon 2 of <i>UGT1A1</i> ; or L413P	Dermal fibroblasts	2 month old, 19, 21 y/o M, F	RV4	Hepatocyte-like cells (fetal)	n.d.	n.d.	No
Hereditary tyrosinemia type I	(Ghodsizadeh et al. 2010; Rashid et al. 2010)	553T > G V166G in fumarylaceto-acetate hydrolase	Dermal fibroblasts	2 month old, 6 y/o M, F	RV4	Hepatocyte-like cells (fetal)	n.d.	n.d.	No
Progressive familial hereditary cholestasis	(Ghodsizadeh et al. 2010)	Multi-factorial	Dermal fibroblasts	17 F	RV4	Hepatocyte-like cells (fetal)	n.d.	n.d.	No
Hurler syndrome (MPS II)	(Tolar et al. 2011)	IDUA deficiency: Y167X, W402X; W402X, W402X	Keratinocyte, MSuC	M 1	RV4	Hematopoietic	Yes; higher GAG accumulation	No difference in CD34 or CD45 + cells or colony formation	No

Cardiovascular

(continued)

Table 5.1 (continued)

Disease	Reference	Molecular defect	Donor cell	Age, sex of donor	Method	Differentiated to	Disease phenocopied in	Disease phenocopied in differentiated cells	Drug or functional tests
LEOPARD Syndrome	(Carvajal-Vergara et al. 2010)	Heterozygous T468 M in <i>PTPN11</i>	Fibroblast	25, 34 F, M	RV4	Cardiomyocytes	n.d.	Yes; cardiomyocyte hypertrophy	Antibody microarray: increase EGFR, MEK1 phosphorylation, no pERK response to bFGF
Long QT syndrome	(Moretti et al. 2010)	Dominant R190Q in <i>KCNQ1</i>	Dermal fibroblast	8, 42 M	RV4	Cardiomyocytes	n.a.	Yes; longer QT in ventricular and atrial myocytes; impaired cell membrane targeting of KCNQ1 protein	Decreased IKs current density
<i>Other categories</i>									
Duchenne muscular dystrophy	(Park et al. 2008a; Tchicou et al. 2010)	Deletion of exon 45-52 or 46-50, dystrophin gene	Dermal fibroblast	47, 13, 6 F carrier, M affected	RV4, iLV4	None	n.a.	n.d.	No
Becker muscular dystrophy	(Park et al. 2008a)	Unidentified mutation in dystrophin	Fibroblast	38 M	RV4	None	n.a.	n.d.	No
Dyskeratosis congenita (DC)	(Soldner et al. 2009; Agarwal et al. 2010)	del37L in <i>DKC1</i>	Fibroblast	7, 30 M	RV4, iLV3	None	n.o.	n.d.	No
Cystic fibrosis	(Somers et al. 2010; Warren et al. 2010)	homozygous delta F508 in <i>CFTR</i>	Dermal fibroblast	8, 21, 29, 31, 33 F, M	1eLV4	None	n.d.	n.d.	No
Scleroderma	(Somers et al. 2010)	Unknown	Dermal fibroblast	47 F	1eLV4	None	n.d.	n.d.	No
Osteogenesis imperfecta	(Khan et al. 2010)	G > A in exon 34 of <i>COL1A2</i>	MSC	NK	AAV OSLN	None	n.a.	n.d.	No

Abbreviations: 2i, inhibition of MEK1, GSK3 with PD0325901 and CT99021; A1ATD or AAT, alpha 1-antitrypsin deficiency; ADA-SCID, adenosine deaminase severe combined immune deficiency; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; FMR1, fragile X mental retardation 1; FH, familial hypercholesterolemia; GBA, acid beta-glucosidase; L, Lin28; M, c-Myc; MSC, mesenchymal stem cells; MStrC, mesenchymal stromal cell; MPS1H, mucopolysaccharidosis type I/Hurler syndrome; N, Nanog; n.a., not applicable; n.d., not determined; NK, not known; NS, nervous system; O, Oct4; S, Sox2; SMA, spinal muscular atrophy; VPA, valproic acid. Method abbreviations: AAV, adeno-associated virus; LV3, lentiviral OSK; LV4, lentiviral OSK; RV3, retroviral OSK; RV4, retroviral OSK; LVOSLN, lentiviral OSLN; iLV, inducible lentivirus; eLV, Cre-excisable lentivirus; x, xeno-free; 1eLV, single polycistronic vector excisable lentivirus; T, SV40 large T antigen

et al. 2009; Ye et al. 2009b; Yan et al. 2010). Thus far, in humans, skin fibroblasts and bone marrow mesenchymal cells (Takahashi et al. 2007; Yu et al. 2007; Huangfu et al. 2008), keratinocytes (Aasen et al. 2008; Maherali et al. 2008), peripheral blood cells (Ye et al. 2009b; Loh et al. 2010), melanocytes (Utikal et al. 2009), neural stem cells (Kim et al. 2009), amniotic fluid-derived cells (Li et al. 2009), adipose stem cells from lipoaspirate (Sun et al. 2009), dental stem cells (Tamaoki et al. 2010; Yan et al. 2010) and mesenchymal stem cells from umbilical cord matrix and amniotic membrane (Cai et al. 2010) have been used for reprogramming. Moreover, frozen-banked tissues, and cell lines can also be used although they supply very little clinical information on the specific donor (Colman and Dreesen 2009).

Since the most disease phenotypes are only observed in differentiated cells, only iPSCs generation could provide a source for pluripotency. Monogenic diseases are the most fruitful targets because the gene and often its product are known. Extending this experimental paradigm to diseases with either unknown or more complex, multifactorial phenotypes or diseases and to model disease with a long latency such as Alzheimer's or Parkinson's Disease would be challenging (Colman and Dreesen 2009). For the diseases that exhibit a late onset in humans, kinetics of disease pathology could be stimulated in the cell culture dish by exposing the cells to in vitro experimental stress (e.g. serum starvation, O₂ reduction, heat shock, etc.) (Saha and Jaenisch 2009). On the other hand, Colman and Dreesen (2009) have emphasized that "late onset" term does not reflect subclinical developments that may occur a lot earlier and may be captured by the in vitro methodology.

Taken together, it is obvious that the disease pattern will direct to alternatives for donor cell type. Since the detection of the mutations from the diseases such as SMA could be possible in all cell types of the patient, skin biopsies can be used as readily accessible donor cells. On the other hand, heterozygous genotype of most of the hematopoietic disorders could be detected only in particular progenitor. Hence, those progenitors should be chosen as cell sources for reprogramming (Ebert et al. 2009; Saha and Jaenisch 2009; Ye et al. 2009b).

Moreover, recent reports about persistent epigenetic imprinting in iPSCs (Kim et al. 2010; Polo et al. 2010) would be useful for an opportunity to researches on sporadic and multifactorial diseases. Although those persistent imprinting manifests as differential gene expression and alters differentiation capacity, it may be utilized in potential therapeutic applications to enhance differentiation into desired cell lineages (Kim et al. 2010; Polo et al. 2010). Especially for the diseases that have a background of combination of genetic and environmental factors, persistent epigenetic memory would be an advantage. In those diseases any epigenetic alterations would be studied via iPSCs carrying parental imprinting. The cells derived from the patients suffering from same disease but living in different geographical regions could give us important clues for environmental factors, such as toxic metals and pesticides, life styles and dietary habits which may effect the epigenome and reflect risk factors (Jaenisch and Bird 2003). Lastly, for the non-cell autonomous diseases, possible success with one cell type may affect the other pathological mediators (Colman and Dreesen 2009).

5.3 Identification of iPSC Colonies

There are several methods or techniques to select or distinguish successfully reprogrammed clones from partially reprogrammed or simply transformed colonies (Stadtfield and Hochedlinger 2010):

1. The reactivation of endogenous pluripotency-associated genes linked to drug selection cassettes. Fbxo15, Nanog or Oct4 and Klf4 (Takahashi and Yamanaka 2006; Maherali et al. 2007; Okita et al. 2007; Wernig et al. 2007; Pfannkuche et al. 2009),
2. Lentiviral vector systems carrying promoter fragments of pluripotency genes (Hotta et al. 2009),
3. For human iPSCs, TRA-1-81 expression (Lowry et al. 2008),
4. "Indicator retroviruses" expressing fluorescent proteins, which become silenced upon acquisition of pluripotency (Chan et al. 2009),
5. Using only morphological criteria (Blelloch et al. 2007; Maherali et al. 2007; Meissner et al. 2007),
6. The combination of morphological selection and doxycycline-inducible vectors (Stadtfield et al. 2008),
7. For mouse iPSCs, GH2 gene expression (Liu et al. 2010; Stadtfield et al. 2010),
8. MEG-3 gene as human homolog of GH2 to identify human iPSCs (Stadtfield and Hochedlinger 2010).

The generation of patient/disease-specific iPSCs follows standard methods. In brief, target cells are infected with reprogramming system carrying reprogramming factors. After several days, infected cells are trypsinized and replated onto feeder layer cells and media is replaced with standard human ESC media the next day and changed every day thereafter. When appeared, human ESC like colonies are picked mechanically or selected by the systems or methods described above and is passaged. Then pluripotency is evaluated according to the similarity of putative to ESCs (Fig. 5.1). To confirm proper and complete reprogramming, activity of cell cycle profile, normal karyotype maintenance, alkaline phosphatase activity and expression of several ESC-associated antigens (SSEA-3, SSEA-4, TRA1-81, Nanog, etc.), downregulation or lack of immunoreactivity against parental cell specific factors (such as fibroblast-associated antigen TE-7), expression of pluripotency genes (Rex1/Zfp42, Foxd3, Tert, Nanog and Cripto/Tdgf1) should be checked. Reverse-transcription PCR and immunocytochemistry can be used to evaluate specific genes or proteins, whereas further examination of the global expression with a microarray gene analysis is useful (Yoshida and Yamanaka 2010).

Generally embryoid bodies (EBs) are created as a first step by aggregating or placing clumps in suspension culture for the evaluation of in vitro differentiation. The resulting EBs are plated onto plastic gelatin coated dishes and allowed to attach for the outgrowth culture. Thereafter iPSC lines will spontaneously differentiate into cell types representative of the three embryonic germ layers (Maherali et al. 2008).

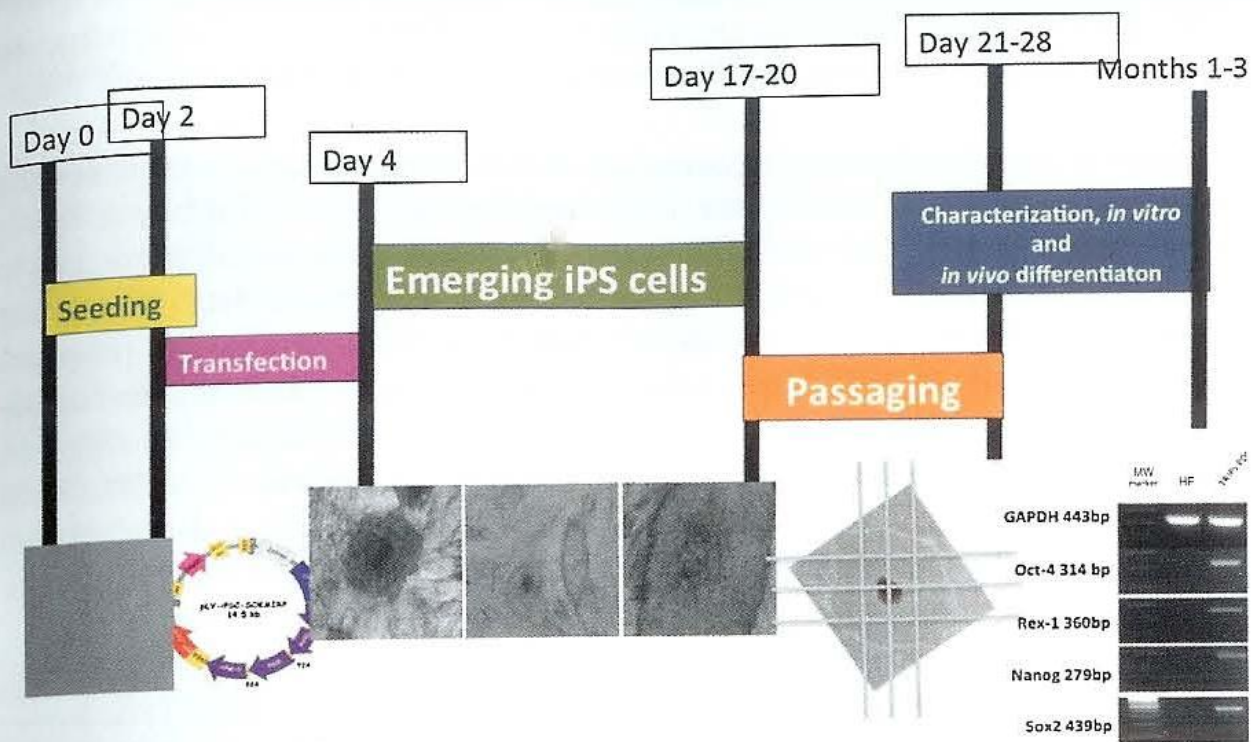


Fig. 5.1 The reprogramming process in dental pulp cells

To determine pluripotency *in vivo*, iPSCs should be injected into immunocompromised NOD-SCID mice for teratoma assay. Histological analyses of the resulting teratomas should show cell types representative of the three germ layers, including for example pigmented cells for ectodermal, lung, respiratory and gut-like epithelia for endodermal, and mesenchyme, adipose tissue and cartilage for mesodermal differentiation. Immunocytochemistry analyses can be used to detect expression of α -smooth muscle actin (α -SMA), desmin, vimentin, etc. for mesoderm, a-fetoprotein (AFP) for endoderm, glia fibrillary acidic protein (GFAP) and β III-tubulin for ectoderm markers (Carvajal-Vergara et al. 2010).

The most stringent criterion for mESC/iPSCs is their ability to generate germline competent adult mouse chimeras and thus germline transmission. For human iPSCs, teratoma formation in immune-deficient mice seems to be acceptable so far (Daley et al. 2009; Yoshida and Yamanaka 2010). Besides, the proposed stringent criteria for miPSCs may not be fully required for applications in which reprogrammed human cell lines are used to model disease processes *in vitro*, and to screen for novel drugs or drug toxicity (Ebert et al. 2009). On the other hand, since current teratoma assays are qualitative in nature, full quantitative assessment of differentiation capacity of generated cell lines could rapidly allow whether those lines retain the capacity for differentiation into three germ layers or had restricted differentiation capacity, even with the lines that fail functional level of forming teratoma. A group of researchers support that the most desirable iPSCs to use for transplantation might be those that do not form teratomas *in vivo* but retain the capacity to differentiate to desired cell types *in vitro*. They proposed that this possibility can only be determined if non-teratoma-forming iPSC lines are fully studied *in vitro* (Ellis et al. 2009). In conclusion, for the purposes of either

regenerative medicine or disease modeling, the cells do not have to be germline- or teratoma-competent, as long as they have the ability to self-renewal and differentiation into the desired target cells (Yamanaka 2009a, b).

It was unclear whether reprogramming of female human cells reactivates the inactive X chromosome, as in mouse. It has been recently shown that human iPSCs derived from several female fibroblasts carry inactive X chromosome in contrast to mouse iPSCs that carry two active X chromosomes. While those data indicate that reversal of X chromosome inactivation is not required for human cell programming, the implications that X chromosome inactivation should take into consideration for the use of female iPSCs with devastating X-linked genetic diseases, such as fragile X syndrome (mutation in FMR1), α -thalassemia (ATR), Rett Syndrome (MECP2), Coffin-Lowry Syndrome (RSK2), DMD, Lesch-Nyhan syndrome (HPR1) and Wiskott-Aldrich Syndrome (WASP) (Tchieu et al. 2010).

5.4 Characterization of Genetic Mutation

The generation of iPSCs from patients with a variety of genetic diseases offers an opportunity to recapitulate both normal and pathological human tissue formation in vitro, hence provide a great tool for disease pathology investigations. If the cells taken from patients having classical Mendelian inherited disorders, point mutations in known genes essential for the given function, molecular mutation analysis such as karyotype analysis and fingerprinting analysis should be carried out (Park et al. 2008b).

To verify that the patient-specific iPSC lines are genetically matched to the donor cells, DNA fingerprinting analysis of the iPSC lines and the donor cells from which they were derived should be done. Additionally, direct sequencing and an allele-specific restriction fragment length polymorphism should be used to compare genotype of iPSC lines with that of the donated host cells. Furthermore, polymerase chain reaction (PCR) analysis of genomic DNA from iPSC lines will reveal that if they carry integrated copies of the transgenes which they have been transduced (Dimos et al. 2008).

5.5 iPSCs Differentiation into Desired Cell Types

Beginning with the first cell lineage decisions, gene expression and mutual interactions between lineage-determining transcription factors with antagonizing functions show stochasticity (Hemberger et al. 2009). The orchestrating role of the gene regulatory network points biological patterns for differentiation. To date, ESC studies have mostly focused on the derivation of subsets of tissue-specific cell populations. Thus, lineage specific differentiation of murine and human ESCs has been shown as a powerful tool for studying early embryonic events and lineage restriction for generating an unlimited cellular supply for cell therapies and tissue

engineering. To produce either progenitors or more mature cells, various exogenous factors were applied in a sequence and time course, which is highly reminiscent of normal development.

Much of the hope invested in patient-specific stem cells is based on the assumption that it will be possible to differentiate them into disease relevant cell types. To differentiate desired cell types within the mixed population of differentiating ESCs, there are several well-established stem cell differentiation protocols mimicking the proper timeline of normal human organogenesis. For hematopoietic, endothelial, osteoblastic, osteoclastic (Tsuneto et al. 2003; Kawaguchi et al. 2005; Grigoriadis et al. 2010), cardiac (Doetschman et al. 1985; Schenke-Layland et al. 2008; Arbel et al. 2010), neural commitment (Ying and Smith 2003), pancreatic (Banerjee et al. 2011), hepatic (Gerbal-Chaloin et al. 2010), chondrogenic and adipogenic differentiations (Wdziekonski et al. 2003) many very well-established protocols have been used. Moreover, cell fate specification and maturation could be selectively altered via manipulation of endogenous developmental signaling pathways (Rathjen and Rathjen 2003; Meyer et al. 2009). The ability to differentiate iPSCs in vitro to specific lineages efficiently and reproducibly has been achieved by using the described protocols with certain modifications (Dimos et al. 2008; Narazaki et al. 2008; Tateishi et al. 2008; Wernig et al. 2008a; Ebert et al. 2009; Hu and Zhang 2009; Jin et al. 2009; Karumbayaram et al. 2009; Pfannkuche et al. 2009; Senju et al. 2009; Tanaka et al. 2009; Taura et al. 2009; Zhang et al. 2009; Carvajal-Vergara et al. 2010; Comyn et al. 2010; Dick et al. 2010; Gamm and Meyer 2010; Huang et al. 2010; Kaichi et al. 2010; Lamba et al. 2010; Lee et al. 2010; Martinez-Fernandez et al. 2010; Parameswaran et al. 2010; Swistowski et al. 2010; Teramura et al. 2010; Zhou et al. 2010).

There are many typical examples for directed differentiation of iPSCs to the cell types influenced by the disease in recent publications (Tateishi et al. 2008; Meyer et al. 2009; Grigoriadis et al. 2010). In those studies the researchers showed that it is possible to generate and fine-tune desired lineages from human somatic cells. In brief, after creating EBs from generated iPSCs, chemically defined differentiation media were used to promote the stepwise production of organ-specific cell types. Therefore using targeted, stepwise differentiation process that follows a normal developmental timeline, the researcher modeled cell and/or organ development with human iPSCs (Ueda et al. 2010).

Differentiation should be confirmed by showing the expressions of transcription factors or surface markers. Apparently, the function of those differentiated cells will be the last point for evaluation (Dimos et al. 2008). Dimos and colleagues demonstrated that skin cells from patients with amyotrophic lateral sclerosis, ALS, could be reprogrammed and subsequently differentiated into disease-free motor neurons (Dimos et al. 2008). Also of note, Ebert et al. (2009) made iPSCs from the fibroblasts of a SMA patient and his unaffected mother. They were the first to demonstrate a preserved patient-specific disease phenotype in motor neurons generated from fibroblast iPSCs. Treatment of these cells in vitro with valproic acid and tobramycin led to an upregulation of survival motor neuron protein synthesis and displayed selective deficits when compared with normal motor neurons.

Today, many iPSC lines could be directed into a differentiated functional cell types. Auditory retinal cells (Jin et al. 2009; Comyn et al. 2010; Lamba et al. 2010; Parameswaran et al. 2010), cardiomyocytes (Narazaki et al. 2008; Pfannkuche et al. 2009; Tanaka et al. 2009; Zhang et al. 2009; Carvajal-Vergara et al. 2010; Kaichi et al. 2010; Martinez-Fernandez et al. 2010), insulin-secreting islet-like clusters (Tateishi et al. 2008), motor neurons (Dimos et al. 2008; Ebert et al. 2009; Hu and Zhang 2009; Karumbayaram et al. 2009), dopaminergic neurons (Wernig et al. 2008a; Cai et al. 2010; Swistowski et al. 2010), auditory spinal ganglion neurons (Nishimura et al. 2009), smooth muscle cells (Taura et al. 2009; Xie et al. 2009), vascular endothelial cells (Taura et al. 2009), dendritic cells and macrophages (Senju et al. 2009; Senju et al. 2010), adipocytes (Tashiro et al. 2009; Taura et al. 2009), osteoblasts (Tashiro et al. 2009), hematopoietic cells (Kauffman 1993; Lu et al. 2009; Okabe et al. 2009; Raya et al. 2009; Kaneko et al. 2010), endothelial progenitor cells (Xu et al. 2009; Abaci et al. 2010; Alipio et al. 2010; Ho et al. 2010; Homma et al. 2010) are available.

Furthermore, Hanna et al. have shown that differentiated iPSCs can be used to rescue organ function in humanized mouse model of sickle cell anemia (Hanna et al. 2007). More recently several other groups have demonstrated the therapeutic potential of iPSCs, both alone and in combination with genetic corrective therapy (Table 5.1). They include the generation of disease-free hematopoietic progenitors from keratinocytes obtained from patients with Fanconi anemia (Raya et al. 2009), the correction of hemophilia in mice using iPSC-derived endothelial progenitors (Xu et al. 2009), and multilineage functional repair of the diseased heart tissue in immunocompetent mice using undifferentiated iPSCs (Nelson et al. 2009). Finally, functional dopamine neurons could be generated from reprogrammed mouse fibroblasts, and transplantation of these neurons could restore dopamine function when grafted in Parkinsonian rats (Wernig et al. 2008a).

References

- Aasen T et al (2008) Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol* 26(11):1276–1284
- Abaci HE et al (2010) Adaptation to oxygen deprivation in cultures of human pluripotent stem cells, endothelial progenitor cells, and umbilical vein endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 298(6):C1527–C1537
- Agarwal S et al (2010) Telomere elongation in induced pluripotent stem cells from dyskeratosis congenita patients. *Nature* 464(7286):292–296
- Alipio Z et al (2010) Sustained factor VIII production in hemophiliac mice 1 year after engraftment with induced pluripotent stem cell-derived factor VIII producing endothelial cells. *Blood Coagul Fibrinolysis* 21(5):502–504
- Arbel G et al (2010) Methods for human embryonic stem cells derived cardiomyocytes cultivation, genetic manipulation, and transplantation. *Methods Mol Biol* 660:85–95
- Baek KH et al (2009) Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1. *Nature* 459(7250):1126–1130
- Banerjee I et al (2011) Impact of co-culture on pancreatic differentiation of embryonic stem cells. *J Tissue Eng Regen Med* 5(4):313–323

- Blelloch R et al (2007) Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell* 1(3):245–247
- Cai J et al (2010) Dopaminergic neurons derived from human induced pluripotent stem cells survive and integrate into 6-OHDA-lesioned rats. *Stem Cells Dev* 19(7):1017–1023
- Carvajal-Vergara X et al (2010) Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 465(7299):808–812
- Chan EM et al (2009) Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotechnol* 27(11):1033–1037
- Colman A, Dreesen O (2009) Pluripotent stem cells and disease modeling. *Cell Stem Cell* 5(3):244–247
- Comyn O et al (2010) Induced pluripotent stem cell therapies for retinal disease. *Curr Opin Neurol* 23(1):4–9
- Daley GQ et al (2009) Broader implications of defining standards for the pluripotency of iPSCs. *Cell Stem Cell* 4(3):200–201; author reply 202
- Dick E et al (2010) Evaluating the utility of cardiomyocytes from human pluripotent stem cells for drug screening. *Biochem Soc Trans* 38(4):1037–1045
- Dimos JT et al (2008) Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science* 321(5893):1218–1221
- Doetschman TC et al (1985) The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 87:27–45
- Ebert AD et al (2009) Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457(7227):277–280
- Ellis J et al (2009) Alternative induced pluripotent stem cell characterization criteria for in vitro applications. *Cell Stem Cell* 4(3):198–199; author reply 202
- Gamm DM, Meyer JS (2010) Directed differentiation of human induced pluripotent stem cells: a retina perspective. *Regen Med* 5(3):315–317
- Gearhart J (1998) New potential for human embryonic stem cells. *Science* 282(5391):1061–1062
- Gerbal-Chaloin S et al (2010) Isolation and culture of adult human liver progenitor cells: in vitro differentiation to hepatocyte-like cells. *Methods Mol Biol* 640:247–260
- Ghodsizadeh A et al (2010) Generation of liver disease-specific induced pluripotent stem cells along with efficient differentiation to functional hepatocyte-like cells. *Stem Cell Rev* 6(4):622–632
- Grigoriadis AE et al (2010) Directed differentiation of hematopoietic precursors and functional osteoclasts from human ES and iPS cells. *Blood* 115(14):2769–2776
- Hanna J et al (2007) Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science* 318(5858):1920–1923
- Hargus G et al (2010) Differentiated Parkinson patient-derived induced pluripotent stem cells grow in the adult rodent brain and reduce motor asymmetry in Parkinsonian rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(36):15921–15926
- Hemberger M et al (2009) Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(8):526–537
- Ho PJ et al (2010) Endogenous KLF4 expression in human fetal endothelial cells allows for reprogramming to pluripotency with just OCT3/4 and SOX2—brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30(10):1905–1907
- Homma K et al (2010) Sirt1 plays an important role in mediating greater functionality of human ES/iPS-derived vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 212(1):42–47
- Hotta A et al (2009) Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nat Methods* 6(5):370–376
- Hu BY, Zhang SC (2009) Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat Protoc* 4(9):1295–1304
- Huang HP et al (2010) Factors from human embryonic stem cell-derived fibroblast-like cells promote topology-dependent hepatic differentiation in primate embryonic and induced pluripotent stem cells. *J Biol Chem* 285(43):33510–33519

- Huangfu D et al (2008) Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* 26(11):1269–1275
- Jaenisch R, Bird A (2003) Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33(suppl):245–254
- Jin ZB et al (2009) Induced pluripotent stem cells for retinal degenerative diseases: a new perspective on the challenges. *J Genet* 88(4):417–424
- Kaichi S et al (2010) Cell line-dependent differentiation of induced pluripotent stem cells into cardiomyocytes in mice. *Cardiovasc Res* 88(2):314–323
- Kaneko S et al (2010) Reprogramming adult hematopoietic cells. *Curr Opin Hematol* 17(4):271–275
- Karumbayaram S et al (2009) Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells* 27(4):806–811
- Kauffman SA (1993) *Self-Organization and Adaptation in Complex System*. Oxford University Press, Oxford
- Kawaguchi J et al (2005) Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone* 36(5):758–769
- Khan IF et al (2010) Engineering of human pluripotent stem cells by AAV-mediated gene targeting. *Mol Ther* 18(6):1192–1199
- Kim JB et al (2009) Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461(7264):649–653
- Kim K et al (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467(7313):285–290
- Lamba DA et al (2010). Generation, purification and transplantation of photoreceptors derived from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One* 5(1):e8763
- Lee G et al (2009) Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461(7262):402–406
- Lee G et al (2010) Derivation of neural crest cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc* 5(4):688–701
- Li W et al (2009) Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. *Cell Stem Cell* 4(1):16–19
- Liu H et al (2010) Generation of endoderm-derived human induced pluripotent stem cells from primary hepatocytes. *Hepatology* 51(5):1810–1819
- Loh YH et al (2010) Reprogramming of T cells from human peripheral blood. *Cell Stem Cell* 7(1):15–19
- Lowry WE et al (2008) Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(8):2883–2888
- Lu M et al (2009) Enhanced generation of hematopoietic cells from human hepatocarcinoma cell-stimulated human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Exp Hematol* 37(8):924–936
- Maehr R et al (2009) Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(37):15768–15773
- Maherali N et al (2007) Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* 1(1):55–70
- Maherali N et al (2008) A high-efficiency system for the generation and study of human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 3(3):340–345
- Mali P et al (2008) Improved efficiency and pace of generating induced pluripotent stem cells from human adult and fetal fibroblasts. *Stem Cells* 26(8):1998–2005
- Marchetto MC et al (2010) A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143(4):527–539
- Martinez-Fernandez A et al (2010) c-MYC independent nuclear reprogramming favors cardiogenic potential of induced pluripotent stem cells. *J Cardiovasc Transl Res* 3(1):13–23
- Mattis VB, Svendsen CN (2011) Induced pluripotent stem cells: a new revolution for clinical neurology? *Lancet Neurol* 10(4):383–394
- Meissner A et al (2007) Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 25(10):1177–1181
- Moretti A et al (2010) Patient-specific induced pluripotent stem-cell models for long-QT syndrome. *N Engl J Med* 363(15):1397–1409

- Meyer JS et al (2009) Modeling early retinal development with human embryonic and induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(39):16698–16703
- Narazaki G et al (2008) Directed and systematic differentiation of cardiovascular cells from mouse induced pluripotent stem cells. *Circulation* 118(5):498–506
- Nelson TJ et al (2009) Repair of acute myocardial infarction by human stemness factors induced pluripotent stem cells. *Circulation* 120(5):408–416
- Nishimura K et al (2009) Transplantation of mouse induced pluripotent stem cells into the cochlea. *Neuroreport* 20(14):1250–1254
- Okabe M et al (2009) Definitive proof for direct reprogramming of hematopoietic cells to pluripotency. *Blood* 114(9):1764–1767
- Okita K et al (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448(7151):313–317
- Osafune K et al (2008) Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol* 26(3):313–315
- Parameswaran S et al (2010) Induced pluripotent stem cells generate both retinal ganglion cells and photoreceptors: therapeutic implications in degenerative changes in glaucoma and age-related macular degeneration. *Stem Cells* 28(4):695–703
- Park IH et al (2008a) Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134(5):877–886
- Park IH et al (2008b) Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134(5):877–886
- Pfannkuche K et al (2009) Cardiac myocytes derived from murine reprogrammed fibroblasts: intact hormonal regulation, cardiac ion channel expression and development of contractility. *Cell Physiol Biochem* 24(1–2):73–86
- Polo JM et al (2010) Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 28(8):848–855
- Rathjen J, Rathjen PD (2003) Lineage specific differentiation of mouse ES cells: formation and differentiation of early primitive ectoderm-like (EPL) cells. *Methods Enzymol* 365:3–25
- Rashid ST et al (2010) Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 120(9):3127–3136
- Raya A et al (2009) Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460(7251):53–59
- Saha K, Jaenisch R (2009) Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell* 5(6):584–595
- Schenke-Layland K et al (2008) Reprogrammed mouse fibroblasts differentiate into cells of the cardiovascular and hematopoietic lineages. *Stem Cells* 26(6):1537–1546
- Senju S et al (2009) Characterization of dendritic cells and macrophages generated by directed differentiation from mouse induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27(5):1021–1031
- Senju S et al (2010) Pluripotent stem cells as source of dendritic cells for immune therapy. *Int J Hematol* 91(3):392–400
- Soldner F et al (2009) Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell* 136(5):964–977
- Somers A et al (2010) Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells* 28(10):1728–1740
- Stadtfeld M, Hochedlinger K (2010) Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 24(20):2239–2263
- Stadtfeld M et al (2008) Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2(3):230–240
- Stadtfeld M et al (2010) A reprogrammable mouse strain from gene-targeted embryonic stem cells. *Nat Methods* 7(1):53–55
- Sun N et al (2009) Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(37):15720–15725
- Swistowski A et al (2010) Efficient Generation of Functional Dopaminergic Neurons from Human Induced pluripotent Stem Cells under Defined Conditions. *Stem Cells* 28(10):1893–1904

- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663–676
- Takahashi K et al (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861–872
- Tamaoki N et al (2010) Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *J Dent Res* 89(8):773–778
- Tanaka T et al (2009) In vitro pharmacologic testing using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 385(4):497–502
- Taranger CK et al (2005) Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell* 16(12):5719–5735
- Tashiro K et al (2009) Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction. *Stem Cells* 27(8):1802–1811
- Tateishi K et al (2008) Generation of insulin-secreting islet-like clusters from human skin fibroblasts. *J Biol Chem* 283(46):31601–31607
- Taura D et al (2009) Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Lett* 583(6):1029–1033
- Tchieu J et al (2010) Female Human iPSCs Retain an Inactive X Chromosome. *Cell Stem Cell* 7(3):329–342
- Teramura T et al (2010) Induction of mesenchymal progenitor cells with chondrogenic property from mouse-induced pluripotent stem cells. *Cell Reprogram* 12(3):249–261
- Thomson JA et al (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282(5391):1145–1147
- Tolar J et al (2011) Hematopoietic differentiation of induced pluripotent stem cells from patients with mucopolysaccharidosis type I (Hurler syndrome). *Blood* 117(3):839–847
- Tsuneto M et al (2003) In vitro differentiation of mouse ES cells into hematopoietic, endothelial, and osteoblastic cell lineages: the possibility of in vitro organogenesis. *Methods Enzymol* 365:98–114
- Ueda T et al (2010) Generation of functional gut-like organ from mouse induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 391(1):38–42
- Unternaehrer JJ, Daley GQ (2011) Induced pluripotent stem cells for modelling human diseases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2274–2285
- Urbach A et al (2010) Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 6(5):407–411
- Utikal J et al (2009) Sox2 is dispensable for the reprogramming of melanocytes and melanoma cells into induced pluripotent stem cells. *J Cell Sci* 122(Pt 19):3502–3510
- Wakayama T et al (2001) Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292(5517):740–743
- Warren L 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
- Wdziekonski B et al (2003) Development of adipocytes from differentiated ES cells. *Methods Enzymol* 365:268–277
- Wernig M et al (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* 448(7151):318–324
- Wernig M et al (2008) A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nat Biotechnol* 26(8):916–924
- Xie CQ et al (2009) A comparison of murine smooth muscle cells generated from embryonic versus induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 18(5):741–748
- Xu D et al (2009) Phenotypic correction of murine hemophilia A using an iPS cell-based therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(3):808–813
- Yamanaka S (2009a) Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 460(7251):49–52
- Yamanaka S (2009b) A fresh look at iPS cells. *Cell* 137(1):13–17

- Yan X et al (2010) iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev* 19(4):469–480
- Ye L et al (2009a) Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(24):9826–9830
- Ye Z et al (2009b) Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood* 114(27):5473–5480
- Ying QL, Smith AG (2003) Defined conditions for neural commitment and differentiation. *Methods Enzymol* 365:327–341
- Yoshida Y, Yamanaka S (2010) Recent stem cell advances: induced pluripotent stem cells for disease modeling and stem cell-based regeneration. *Circulation* 122(1):80–87
- Yu J et al (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318(5858):1917–1920
- Zhang J et al (2009) Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res* 104(4):e30–e41
- Zhou J et al (2010) High-Efficiency Induction of Neural Conversion in hESCs and hiPSCs with a Single Chemical Inhibitor of TGF-beta Superfamily Receptors. *Stem Cells* 28(10):1741–1750
- Zhu H et al (2011) Investigating monogenic and complex diseases with pluripotent stem cells. *Nat Rev Genet* 12(4):266–275

Chapter 6

Challenges to Therapeutic Potential of hiPSCs

In a metazoan body all cells possess the same set of genes. Exceptions for this condition are post-meiotic germ cell lines, mature lymphocytes and cells in species that exhibit chromosome diminution (Kloc and Zagrodzinska 2001). Therefore, generating a pluripotent cell in vitro and directing its conversion into a specific differentiated cell fate, which means rewinding the internal clock of any mammalian cell to an embryonic state and then forwarding this high potential cell to diseased cells, represents a rational and ongoing approach in regenerative medicine. On the other hand, quality control and safety are the main concerns and there are several technical challenges in using human iPSCs in treatment of several irreparable human diseases. To minimize or eliminate genetic alterations in the derived iPSC line creation factor-free human iPSCs are necessary. Defining a disease-relevant phenotype needs in vitro and in vivo models. Moreover, to generate markers for differentiation and gene corrections, gene-targeting strategies are necessary. Besides, cell-type specific lineage reporters, lineage-tracking tools and tools to disrupt, repair or overexpress genes should be developed in order to model many human diseases (Saha and Jaenisch 2009).

Since cellular functions are influenced by microenvironmental stimuli, it is important to evaluate the results obtained from iPSC studies regarding the reprogramming method, culture conditions and differentiation protocols, which all influence the outcome (Daley et al. 2009). Kim et al. (2010) revealed several important facts about reprogramming and resultant iPSCs: first, tissue source influences the efficiency and fidelity of reprogramming. Second, there are substantial differences between iPS and embryo-derived ES cells. Third, the differentiation propensity and methylation profile of iPSCs could be reset. Finally and most strikingly, NT-derived ESCs are more faithfully reprogrammed than most iPSCs generated from adult somatic tissues (Kim et al. 2010).

In addition, in order to determine whether derived iPSCs are specific to a given cell line or to a pluripotency, healthy wild-type controls should be used. Although established human ESC or iPSC lines could be used for this purpose, additionally a panel of lines derived from the same patient or unrelated patients suffering from

the same disease would give valuable information. On the other hand, in single gene diseases, genetically modified iPSCs could represent an ideal isogenic control (Colman and Dreesen 2009; Saha and Jaenisch 2009). However, isogenic generation of iPSC lines would be applied only to diseases with known genetic causes (Mattis and Svendsen 2011).

Although there are still many challenges regarding the identity of iPSCs, a couple of reports are available so far to overview a disease phenotype in vitro (Ebert et al. 2009; Lee et al. 2009; Raya et al. 2009; Ye et al. 2009). Since human ESC lines display variable outcomes in differentiating into specific lineages (Osafune et al. 2008), multiple iPSC lines generated from a single patient are extremely favorable because of providing identical genetic backgrounds. The challenges for reprogramming technology can be summarized as follows:

1. Traditional reprogramming techniques may not be satisfactory,
2. Presence of viral vectors,
3. Availability of reliable and repeatable protocols for complete differentiation to a tissue type of choice,
4. Variability in the ability of differentiating to a population of choice and differentiated cells are generally short lived,
5. Necessity of ESC comparisons/lack of proper control,
6. Aberrations in prolonged cultures,
7. Non-cell-autonomous phenotypes and diseases of aging,
8. Low penetrance and modest or undetectable phenotypes for polygenic or complex factors (Mattis and Svendsen 2011; Zhu et al. 2011).

Lack of immunogenicity has been the biggest hope for using custom-made, patient-specific adult cells derived from iPSCs to treat patients with a wide range of diseases. However, Zhao and colleagues showed very recently that virally or episomally produced iPSCs are immunogenic (Zhao et al. 2011). In this simple but smart experimental approach, the researchers injected autologous ESCs, unmatched ESCs and autologous iPSCs derived from fetal fibroblasts into the matched mice. Surprisingly, iPSCs, like unmatched ESCs were rejected by the immune system. Since the viral vectors used for reprogramming could have been responsible for immune response, using episomal vectors had been used. Even with this setting immune rejection was persistent albeit with a weakened response. Overall the data were unexpected: in teratoma formation assay autologous iPSCs were immunogenic than matched ESCs (Zhao et al. 2011). Furthermore, the authors suggested that T-cell dependent immune response in syngeneic recipients by abnormal gene expression in some cells differentiated from iPSCs might be the reason for the immunogenicity of iPSCs in this study. Gene expression profiles of iPSC-derived teratomas were analyzed and it was found that a group of nine genes was expressed at abnormally high levels. The induced expression of three of those 9 genes (Hormad1, Zg16 and Cyp3a11) prevented teratoma formation by non-immunogenic ESCs. As a result, Zhao et al. (2011) suggested that the expression of these minor antigens could be another proof regarding the epigenetic difference between iPSCs and ESCs.

Although immature iPSCs would never be used for transplantation in clinical settings (Apostolou and Hochedlinger 2011), differentiated cells derived from iPSCs could also be immunogenic. It has been shown that upon transplantation, ESC-derived cells could express additional molecules while they are maturing in vivo. Therefore, they become more immunogenic (Swijnenburg et al. 2005).

It is clear that there are still important issues resisting the accumulating hopeful data regarding the therapeutic usage of stem cells. Taylor et al. (2011) scrutinized the controversy about immunogenicity of stem cell-derived tissues. The authors stated that the documentation of HLA (or MHC) expression by ESCs has shaded the reality that any transplanted stem cell-derived tissues, if they are not genetically identical to the recipient, has the potential to induce allograft rejection via “indirect” recognition (Taylor et al. 2011). Besides, absence of the expression of HLA molecules cannot prevent immunological rejection because of activation of NK cells (Bryceson and Long 2008).

Although it is still unclear whether any of the iPSC lines can be used for future cell therapy, it should be quite useful to establish the clinical-grade iPSC banks with a sufficient repertoire of HLA types. Recently, Nakatsuji (2010) estimated that a collection of unique iPSC lines having homozygous alleles of the 3 HLA loci (A, B, and DR) would enable full matching for 80–90% of the Japanese population with a perfect match (Nakatsuji 2010). In addition, Tamaoki et al. (2010) attempted to use dental pulp stem cells to generate iPSC banking having a sufficient repertoire of HLA types. They also reported the possibility of identifying homozygous donors for human iPSC lines for the construction of such HLA-type banking. The practical isolation and handling of dental pulp cells may make it easy to expand the size of the bank in multiple institutes and even establish a number of iPSC lines homozygous for the 3 HLA loci (Tamaoki et al. 2010). In conclusion, establishing stem cell banks that contain pluripotent cells that are closely matched or compatible for HLA along with the induction of antigen-specific immunological tolerance instead of life-long immunosuppressive therapy are hopes for the avoidance of immunological rejection (Taylor et al. 2011).

6.1 Is Reprogramming Necessary for Regenerative Therapies?

Along with epigenetic discussion another important question is whether it is necessary to reprogram cells back to pluripotent stem cell state or not. For regenerative therapies pluripotency may not be a prerequisite for the generation of certain differentiated cell types.

The experimental transdifferentiation of B cells into macrophages, and pancreatic exocrine cells into insulin producing β -cells provides good examples for direct conversion of one cell type into another (Xie et al. 2004; Zhou et al. 2008).

It has been shown that overexpression or deletion of individual transcription factors could change the cell fate in somatic cells (Hochedlinger and Plath 2009). Moreover, culturing stem cells in defined culture conditions can initiate differentiation programs (Kocafe et al. 2010). Besides, it has been recently shown that the direct conversion of fibroblasts to functional neurons with no prior pluripotent stage is quite possible (Vierbuchen et al. 2010). Fibroblasts have also been transdifferentiated into cardiomyocytes using a pool of 13 transcription and epigenetic remodeling factors (Ieda et al. 2010). Subsequently, only three (*GATA4*, *MEF2C* and *TBX5*) were found to be enough to drive the genetic program regulating cardiomyocyte differentiation (Lin et al. 1997; Garg et al. 2003; Ghosh et al. 2009).

Masip et al. (2010) described, “induced transdifferentiated (iT) cells,” as a novel tool for adult cell fate modification. Interconversion between adult cells from ontogenically different lineages by an induced transdifferentiation process is based on the overexpression of a single or cocktail of transcription factors. Since there is no attempt to reach through an embryonic stem cell-like state, iT cells may provide an alternative for regenerative medicine. On the other hand, like iPS cells, they also need safe methods with transient and/or non-integrative tools for generation. Moreover they also need in vivo assays to determine the suitability of their transplantation and applicability in regenerative medicine (Masip et al. 2010).

In conclusion, as Meissner stated, the identification of putative enhancers, miRNAs, and large intergenic non-coding (linc) RNAs may help us to gain further insights into the transcriptional regulation and the role of epigenetic modifications (Meissner 2010). However, the flowing information coming from the rapidly advancing field of non-coding RNAs clearly shows that we are still far from understanding how the epigenetic machinery operates cells (Meissner 2010). iPSCs opened a new era in regenerative medicine since the most desirable achievement in cell biology research would be getting a genuine regenerative response from a pluripotent cell that can differentiate into almost any cell type. Moreover, iPSCs could break the walls of fundamental hypothesis in cell biology. These cells not only changed the broadly accepted and deeply rooted thoughts about terminally differentiated cells in developmental biology, but also helped us to understand how a cell uses its very existing potential to produce other cell types. By compelling the limits of conventional biology, iPSCs opened a new era for biologists who need more than words some conceivable formulas generating from fundamental laws of mathematics and physics to understand complex and emergent behavior of lineage commitment and pluripotency. There is an emergent field in cell biology that aims to clarify the unfathomably complex interactions of genes by using general concepts or principles of physics and mathematics to establish a firm theoretical foundation. Those quantitative models of cell state transitions give us an opportunity to guide future experimentation aimed at dissecting, and therefore directing the mechanisms of cell transitions (Hanna et al. 2010). We would say, iPSCs changed the minds so radically that we may be ready to move using our theoretical backgrounds in a different way.

References

- Apostolou E, Hochedlinger K (2011) Stem cells: iPSC cells under attack. *Nature* 474(7350):165–166
- Bryceson YT, Long EO (2008) Line of attack: NK cell specificity and integration of signals. *Curr Opin Immunol* 20(3):344–352
- Colman A, Dreesen O (2009) Pluripotent stem cells and disease modeling. *Cell Stem Cell* 5(3):244–247
- Daley GQ et al (2009) Broader implications of defining standards for the pluripotency of iPSCs. *Cell Stem Cell* 4(3):200–201; author reply 202
- Ebert AD et al (2009) Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457(7227):277–280
- Garg V et al (2003) GATA4 mutations cause human congenital heart defects and reveal an interaction with TBX5. *Nature* 424(6947):443–447
- Ghosh TK et al (2009) Physical interaction between TBX5 and MEF2C is required for early heart development. *Mol Cell Biol* 29(8):2205–2218
- Hanna JH et al (2010) Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143(4):508–525
- Hochedlinger K, Plath K (2009) Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 136(4):509–523
- Ieda M et al (2010) Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* 142(3):375–386
- Kim K et al (2010) Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467(7313):285–290
- Kloc M, Zagrodzinska B (2001) Chromatin elimination—an oddity or a common mechanism in differentiation and development? *Differentiation* 68(2–3):84–91
- Kocafe C et al (2010) Reprogramming of human umbilical cord stromal mesenchymal stem cells for myogenic differentiation and muscle repair. *Stem Cell Rev* 6(4):512–522
- Lee G et al (2009) Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature* 461(7262):402–406
- Lin Q et al (1997) Control of mouse cardiac morphogenesis and myogenesis by transcription factor MEF2C. *Science* 276(5317):1404–1407
- Masip M et al (2010) Reprogramming with defined factors: from induced pluripotency to induced transdifferentiation. *Mol Hum Reprod* 16(11):856–868
- Mattis VB, Svendsen CN (2011) Induced pluripotent stem cells: a new revolution for clinical neurology? *Lancet Neurol* 10(4):383–394
- Meissner A (2010) Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat Biotechnol* 28(10):1079–1088
- Nakatsuji N (2010) Banking human pluripotent stem cell lines for clinical application? *J Dent Res* 89(8):757–758
- Osafune K et al (2008) Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol* 26(3):313–315
- Raya A et al (2009) Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconi anaemia induced pluripotent stem cells. *Nature* 460(7251):53–59
- Saha K, Jaenisch R (2009) Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell* 5(6):584–595
- Swijnenburg RJ et al (2005) Embryonic stem cell immunogenicity increases upon differentiation after transplantation into ischemic myocardium. *Circulation* 112(9 Suppl):I166–I172
- Tamaoki N et al (2010) Dental pulp cells for induced pluripotent stem cell banking. *J Dent Res* 89(8):773–778
- Taylor CJ et al (2011) Immunological considerations for embryonic and induced pluripotent stem cell banking. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2312–2322

- Vierbuchen T et al (2010) Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463(7284):1035–1041
- Xie H et al (2004) Stepwise reprogramming of B cells into macrophages. *Cell* 117(5):663–676
- Ye Z et al (2009) Human-induced pluripotent stem cells from blood cells of healthy donors and patients with acquired blood disorders. *Blood* 114(27):5473–5480
- Zhao T et al (2011) Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature* 474(7350):212–215
- Zhou Q et al (2008) In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 455(7213):627–632
- Zhu H et al (2011) Investigating monogenic and complex diseases with pluripotent stem cells. *Nat Rev Genet* 12(4):266–275

Chapter 7

New Approach to Understand the Biology of Stem Cells

Colebrook (2002) claims that we are in a post-linguistic era and need to develop theories and approaches that are not language dependent. On the other hand, we have been dedicated firmly to use only language to describe extremely complex and interactive events in biology. If we think that mathematics is the language of nature then we should be able to represent and understand everything around us through numbers. When we turn those numbers of any system to the graphs, patterns emerge. Hence, there are patterns everywhere in nature (Aronofsky 1998). The way complex systems and patterns arise out of a multiplicity of relatively simple interactions is called emergence. Therefore, emergence is central to the theories of integrative levels and of complex systems (Corning 2002).

However, in twentieth century of the science, I assume that we are like colorblind humans in biology reminding very didactic story of Leon Lederman with Dick Teresi (1993) in their book called *The God Particle*. In this story some intelligent beings, who cannot see objects with sharp black and white, from imaginary planet Twilo come to the planet on a goodwill mission. To give them a test of our culture, hosts take them to World Cup soccer match as the most popular cultural event on the planet. Since they cannot see black-and-white, they watch the game with polite but confused looks on their faces. Lederman continues:

As far as the Twiloans are concerned, a bunch of short-pantsed people are running up and down the field kicking their legs pointlessly in the air, banging into each other, and falling down. At times an official blows a whistle, a player runs to the sideline, stands there, and extends both his arms over his head while the other players watch him. Once in a great while the goalie inexplicably falls to the ground, a great cheer goes up, and one point is awarded to the opposite team.

The Twiloans spend about 15 min being totally mystified. Then, to pass the time, they attempt to understand the game. Some use classification techniques. They deduce, partially because of the clothing, that there are two teams in conflict with one another. They chart the movements of the various players, discovering that each player appears to remain more or less within a certain geographical territory on the field. They discover that different players display different physical motions. The Twiloans, as humans would do, clarify their search for meaning in World Cup soccer by giving names to the different positions played by each footballer. The positions are categorized, compared, and contrasted. The

quantities of cells and tissues from specific sets of patients; however, it is still unclear whether cells that came from reprogramming technology would reconstitute the tissues at the diseased sites is still unclear (Saha and Jaenisch 2009). Now we may think more deeply whether the human body is a machine where broken parts are replaceable with the spare parts.

The very contemporary insights are incorporated into evolutionary theory and complexity in Goodwin's (1996) mentioned book. He defines organisms as:

Organisms are endowed with powerful particulars that give them the capacity to regenerate and reproduce their own natures under particular conditions, whereas inanimate systems cannot.

This is an emergent property of life that is not explained by the properties of the molecules out of which organisms are made, for molecules do not have the capacity to make a whole from a part. DNA and RNA can make copies of themselves under particular conditions, but this is a self-copying process, not one in which a more complex whole is generated from a part. This is a principle reason organisms cannot be deduced to their genes or molecules. The particular type of organization that exists in the dynamic interplay of the molecular parts of an organism, which I have called a morphogenetic or a developmental field, is always engaged in making and remaking itself in life cycles and exploring its potential for generating new wholes.

...

We have now recovered organisms as the irreducible entities that are engaged in the process of generating forms and transforming them by means of their particular qualities of action and agency, or their causal powers. This includes hereditary particulars that give organisms a type of memory, and the intimate relations of dependence and influence between organisms and their environments. The life cycle includes genes, environmental influences, and the generative field in a single process that closes on itself and perpetuates its nature generation after generation. Species of organisms are therefore natural kinds, not the historical individuals of Darwinism. The members of a species express a particular nature (p 176–177).

Goodwin's statements parallel to German philosopher Immanuel Kant on the distinction between mechanisms and organisms are legendary:

Kant described a mechanism as a functional unity in which the parts exist for one another in the performance of a particular function. ... An organism, on the other hand, is a functional and a structural unity in which the parts exist for and by means of one another in the expression of a particular nature. This means that the parts of an organism—leaves, roots, flowers, limbs, eyes, heart, brain—are not made independently and then assembled, as in a machine, but arise as a result of interactions within the developing organism. ... So organisms are not molecular machines. They are functional and structural unities resulting from a self-organizing, self-generating dynamic (p. 197).

The emergent qualities that are expressed in biological form are directly linked to the nature of organisms as integrated wholes, which can be studied experimentally and stimulated by complex nonlinear models (p. 199).

Furthermore, Goodwin explains how our realization of a human being influence the way of treating the illness:

If humans are to be understood essentially in terms of genes and their products, then illness is to be corrected by manipulating them. The result is drug-based medicine and genetic counseling or engineering. These can be extremely effective in certain circumstances, but medical care based on this approach focuses on illness rather than on health (p. 205).

Finally the writer cited Ingold's (1990) statement:

Organisms and persons are not the effect of molecular and neuronal causes, of genes and traits, but instances of the unfolding of the total relational field. They are formed from relationships, which in their activities they create anew (p. 210).

Such novel insights need to exceed strong barriers in cell biologists who are very loyal to conventional theories of life. Fortunately, those ideas are coming with a simple mathematics and physics as much as possible.

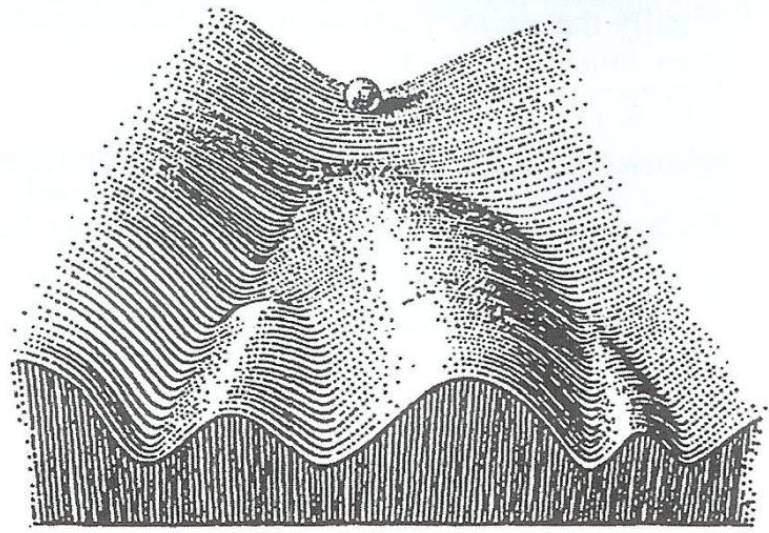
7.2 Changed Paradigm: Reprogramming as Rare But Robust Process

During development, there is a gradual loss of differentiative potency proceeding from totipotency to pluripotency and multipotency in committed cell lineages toward terminal differentiation (Hemberger et al. 2009). The thought was broadly accepted and deeply rooted for many years in developmental biology that once a cell has terminally differentiated and become lineage committed, then it loses the potential of producing other cell types (Huang 2009).

In late 1950s Waddington introduced the term epigenetics to describe the unfolding of the genetic program for development. To Waddington, epigenetics was not very different from embryology, but it was a theory of development that proposed the early embryo was undifferentiated, and changed it to epigenetics (Waddington 1959). His epigenetic landscape is a metaphor to represent the way that developmental decisions are made. One common metaphor was a ball placed on a landscape, where the shape of the landscape "attracts" the ball more likely to follow certain channels and end up in certain places (Fig. 7.2). These lowest points represent the eventual cell fates, that is, tissue types. All the cells in the embryo would evolve according to the same laws, but because of the existence of inducing signals, cells in different regions would follow different pathways and end up at different attractors, which can be elegantly associated with different states of terminal differentiation. Once in its final valley, the ball cannot easily cross the mountain into neighboring valleys or return to the beginning (Waddington and Robertson 1966; Slack 2002).

Since the NT experiments have shown that, the nucleus of most, if not all, adult cells retains nuclear plasticity and can be rebooted to an embryonic state (Byrne et al. 2007), the recent groundbreaking reversion of this assumingly and potentially irreversible developmental process by the derivation of mouse iPSCs from adult dermal fibroblasts has surprised many cell biologists (Takahashi and Yamanaka 2006). While Waddington's epigenetic landscape metaphor is available to understand differentiation status of a cell, further explanations are needed to understand molecular nature and epigenetic barriers for reprogramming. It is obvious that the cell-fate determination and reprogramming are complex systems by emerging patterns from divergent genetic and epigenetic signals.

Fig. 7.2 In Waddington's landscape [from reference Waddington (1957)] ball represents a totipotent fertilized egg. It will differentiate into various lineages while the ball rolls down from the valley



7.3 From Reductionism to Wholeness

As Sui Huang (2011) stated clearly, molecular pathways, typically schematized in the form of an arrow–arrow diagram ($A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow \text{etc.}$), represent biochemical cascades and are seen as the molecular embodiment of chains for many cell phenotypes. Hence, researchers preferred to use that arrow–arrow diagram in order to explain cell-fate decisions leading to describe many cell phenotypes. However, flood of genome-wide expression data along with many ‘omics’ data weakened this comfortable notion very much. This recent data set out the unfathomable complexity of molecular networks with their impenetrable density, therefore arrow–arrow schemes of reductive approaches of cell biology lost its clarity and simplicity (Huang and Wikswo 2006). Precluding the development of the concepts for understanding the collective parts is the biggest complication of the efforts to discover pluripotency and their molecular targets. The need for integrative approaches in the form of networks has started to be perceived among scientist in the middle of twentieth century (Kauffman 1969). Today *emergent* collective behaviors, e.g. pluripotency versus lineage commitment, can be explained by nested binary choices at the regulatory network-designed cell behavior level, which is far from simple linear causal explanation (Huang 2011).

Sui Huang, one of the pioneers of system biology is offering simple, generalizable patterns or principles that can be grasped by the human mind not withstanding the complexity of molecular interactions. This theoretical foundation is available to satisfy our intuitive comprehension by consistency with physical and mathematical principles (Huang 2011).

Huang (2004) tried to set up a pedagogical framework to describe sources of cellular states by the help of a complex high-dimensional integrated dynamical system. Huang, used natural and expected “the ground state” character of pluripotency to explain rarity and robustness of reprogramming events (Figs. 7.2, 7.3).

In order to understand the basics of dynamical system theory we need to get familiar with state spaces, attractors and regulatory networks. Therefore we may take the ball from Waddington's landscape and throw it into a bowl. Ball will

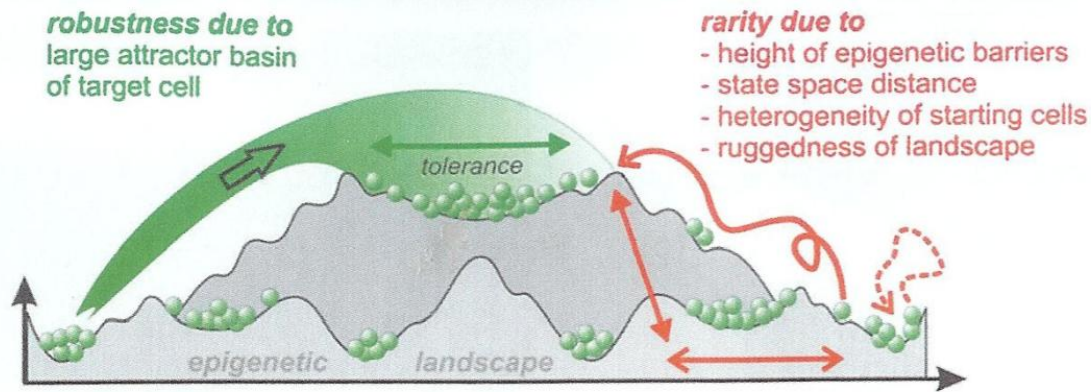


Fig. 7.3 Illustration of the co-existence of rarity and robustness in reprogramming the pluripotent state (“jumping back”). Note the “subattractors” (“wash-board potentials”) as manifestation of the ruggedness of the epigenetic landscape, which imposes intermediate states that slow down the reprogramming events (with permission, from Huang 2009)

move around the bowl until it eventually comes to rest at the lowest point in the bowl. In dynamic systems that lowest point is called attractor (because ball was ‘attracted’ to that point). Without a very large perturbation the system becomes locked into a particular attractor. Now the whole ball is what dynamic system calls the basin of attraction of that system (Kauffman 1993). In cell biology, the basins are separated by some unstable states, which constitute the epigenetic barriers. Once an attractor is reached, the associated expression pattern is maintained (Huang 2009).

State space is simply an imaginary map of all the possibilities open to the system, e.g. for a coin toss it is just two points, heads or tails. In cell biology it is gene regulatory circuits. For a bistable gene regulatory circuit if, for instance, gene 1 (unconditionally) inhibits gene 2 or vice versa, there are only 2 possibilities: $X_1 \geq X_2$ or $X_1 \leq X_2$ (Fig. 7.4a). This particular 2-gene then generates two distinct attractor states: S_A has the expression pattern, $X_1 \geq X_2$, and S_B has the complementary pattern, $X_1 \leq X_2$. Since the two attractors can coexist within the same environmental conditions the circuit is said to be bistable. Attractor states are robust, “self-stabilizing”, distinct states (Fig. 7.4b) (Huang 2009, 2011).

Huang (2011) summarizes the network dynamics as follows:

An abstract network state $S(t) = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ at time t , which also represents a particular gene-expression profile, hence the state of a cell, is mapped into a point object characterized by its position.

...

An entire network and its state S at a time t maps into one point in state space. The trajectory in state space captures the coordinated change in gene expression as dictated by the gene-regulatory network. Since the network state S also represents a gene-expression profile, which in turn determines the cell phenotype, a trajectory tracks the cell’s phenotype change. The state space trajectory is thus a directed curve that truly represents a developmental process, such as differentiation. Unlike an arrow in a network diagram or a ‘pathway’ which is merely a shorthand symbol that has been over-interpreted as a causal explanation in biology, the arrow in state space or trajectory (Fig. 7.4c) is a formal physical entity and represents a biological process in its entirety; it is a true path.

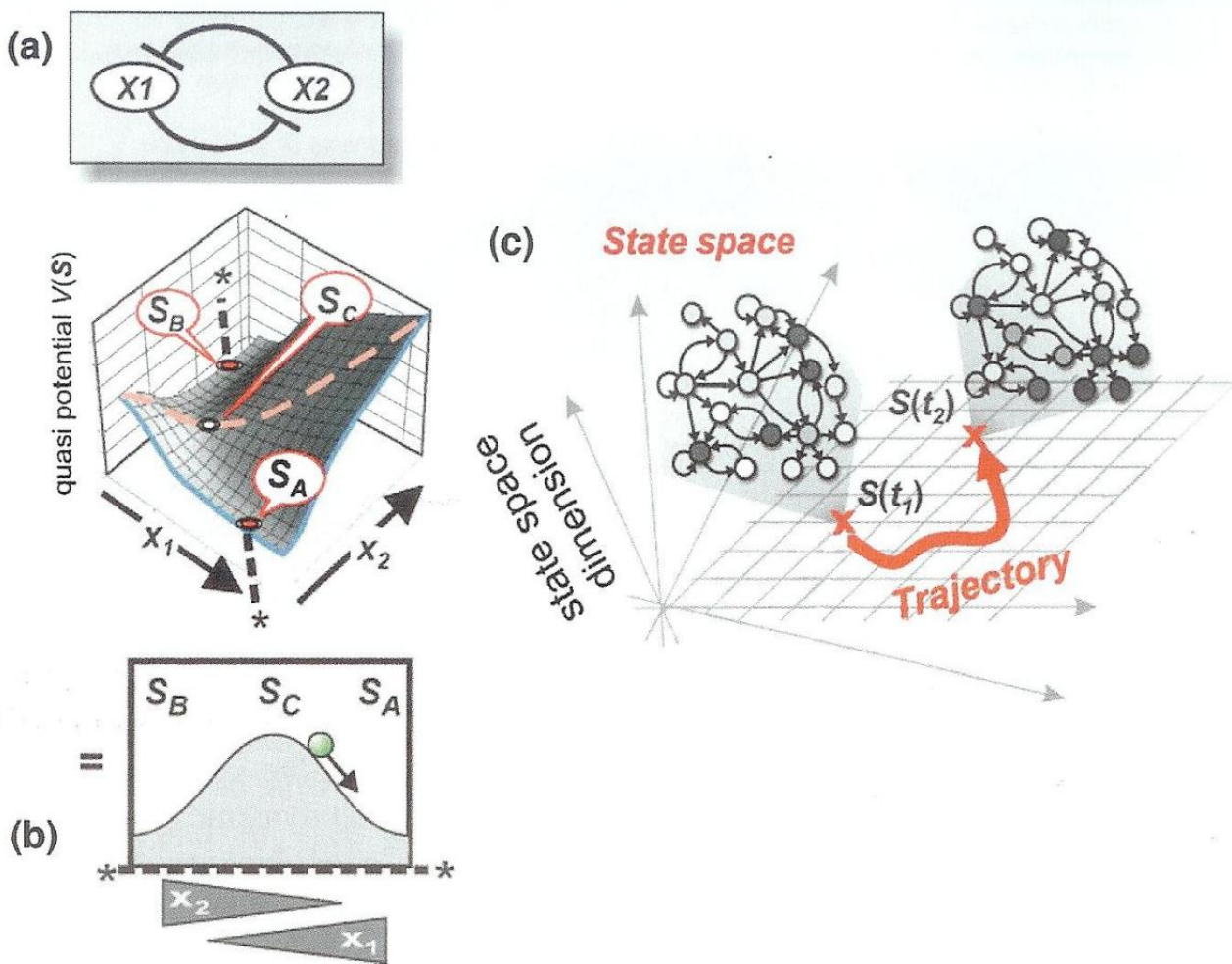


Fig. 7.4 The transformation from arrow–arrow approaches to system biology, which uses state spaces, trajectories and attractors. **a** Circuit architecture of two mutually inhibitory genes and examples of gene regulatory circuits using same binary decisions for cell differentiation in many multipotent cells. **b** *Dashed line* represents the separatrix, dividing the state space into the basins of attraction. *Bottom*: Simplified schematic representations, obtained from cross section along the *dashed line* $*\dots*$. **c** Any point in this space represents a (theoretical) network state S at time t , defined by the expression values x of the subnetwork’s two genes, $S = (x_1, x_2)$ (gene-expression pattern) at time t . Since, as most states, they do not represent stable network states, they are driven by the network interactions to seek a stable state; hence they move in state space along trajectories (*solid line*) that lead to the stable attractor state. The trajectory represents the movement of the state that manifests the regulatory relationship ‘ X_1 inhibits X_2 ’—however, it is modulated by other inputs from the network. The states, S_1 and S_2 , the perturbed trajectory all lie within the state-space region that ‘drain’ to the particular attractor S^* ; hence they all lie within its basin of attraction (with permission, from Huang 2009 and 2011)

Since all of the measurements about molecular networks are snapshots of a fixed moment, it has to ignore completely potentially functional variations. If we imagine a gene regulatory network as state of fluctuating gene expressions, even within homogenous cell populations, having a clear idea about the functional state of cells using mRNA expression values coming from broad range microarray analysis would not be ideal or realistic (Fig. 7.5).

If we go back to Huang’s (2009) epigenetic landscape in Fig. 7.3, we are able to see that in the dynamic perspective, individual cells in a clonal population show fluctuations in their expression levels within the attractor basin and the cells that at

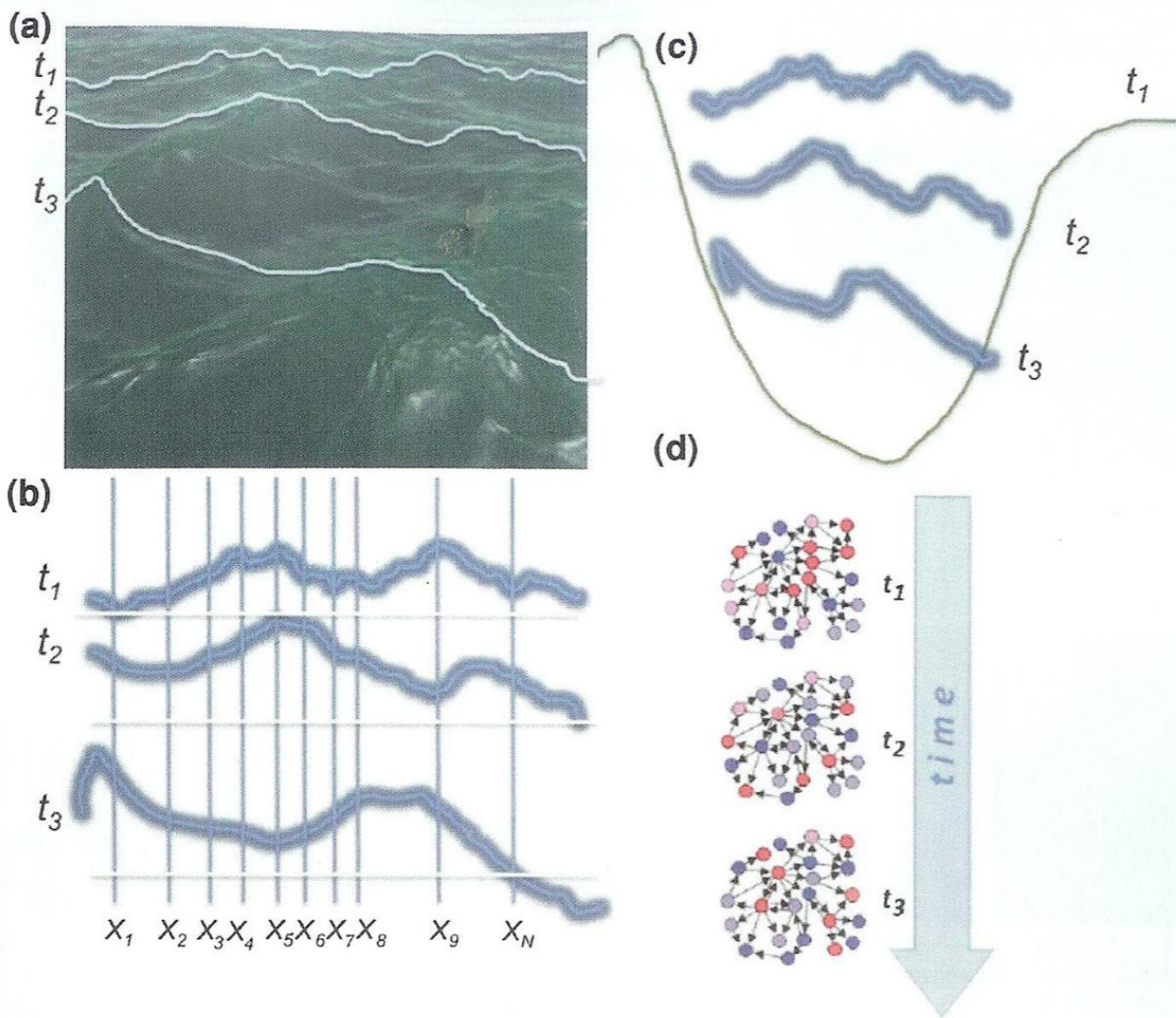


Fig. 7.5 Considering gene expressions as waves in a snapshot of a wavy sea (a), the expression of each individual gene X_1 to X_N would fluctuate in every consequent minute (b), although the phenotype of a cell is stable in a basin of allowed limits of fluctuations (c). Instead of describing interactions of genes in a arrow-to-arrow manner, a graphical representation of whole network would give a better idea through a dynamic system such as molecular network (d). (The graphical representation in d is displayed with the permission of Dr. Sui Huang)

the given time happen to be near the rim of the basin are most responsive to differentiating signals that kick them out of the stem cell attractor or destabilize the latter. Overall, the efforts for inducing differentiation pathways both in somatic or embryonic cells indicate that once the epigenetic barriers are exceeded by any reprogramming events, then the cell-fate changes (Hochedlinger and Plath 2009). If stem cells contain a heterogeneous mixture of microstates, each primed for a distinct fate, then transitioning into each other in a dynamic equilibrium (within the attractor basin) is highly possible when no fate-committing external cue is present (Huang 2009). Since Ying et al. (2008) presented ESCs have an innate program for self-replication that does not require extrinsic instruction; the ground state character of pluripotency can be accepted as natural default state. Then, with the help of Huang's (2009) complex high-dimensional dynamical system, we can understand why reprogramming pluripotency is robust yet rare:

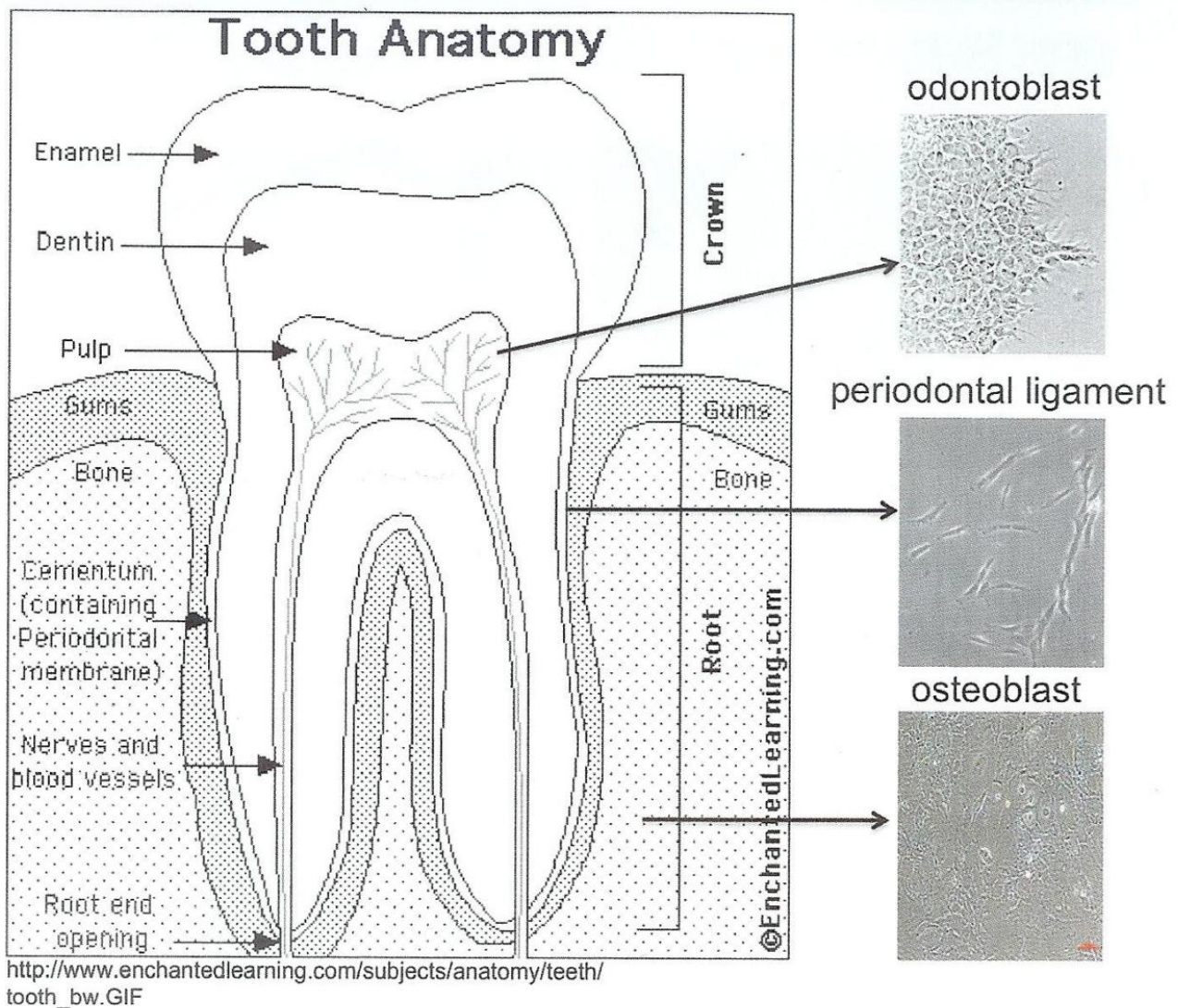


Fig. 7.6 Tooth components. Odontoblasts, periodontal ligaments and osteoblasts are secreting cells of three closely related tissues, dentin, periodontal membrane and alveolar bone

Since the pluripotent state is an attractor state with a rather large basin of attraction, it is robust—a ground state.

And the rarity of reprogramming events can be explained because of the ruggedness of the attractor landscape:

Only a small fraction of the cells in the population, namely those whose fluctuating microstate map into a gene expression pattern that fulfils some particular priming requirement, may actually be responsive to the nature of the reprogramming signals (Fig. 7.3) (Huang 2009).

7.4 More Future Considerations

It is obvious that differentiation and lineage commitment warrant a ground state model. If you could push ontogenically closed cells to a common place, mimicking differentiation pathways would follow the pathways through cellular specification

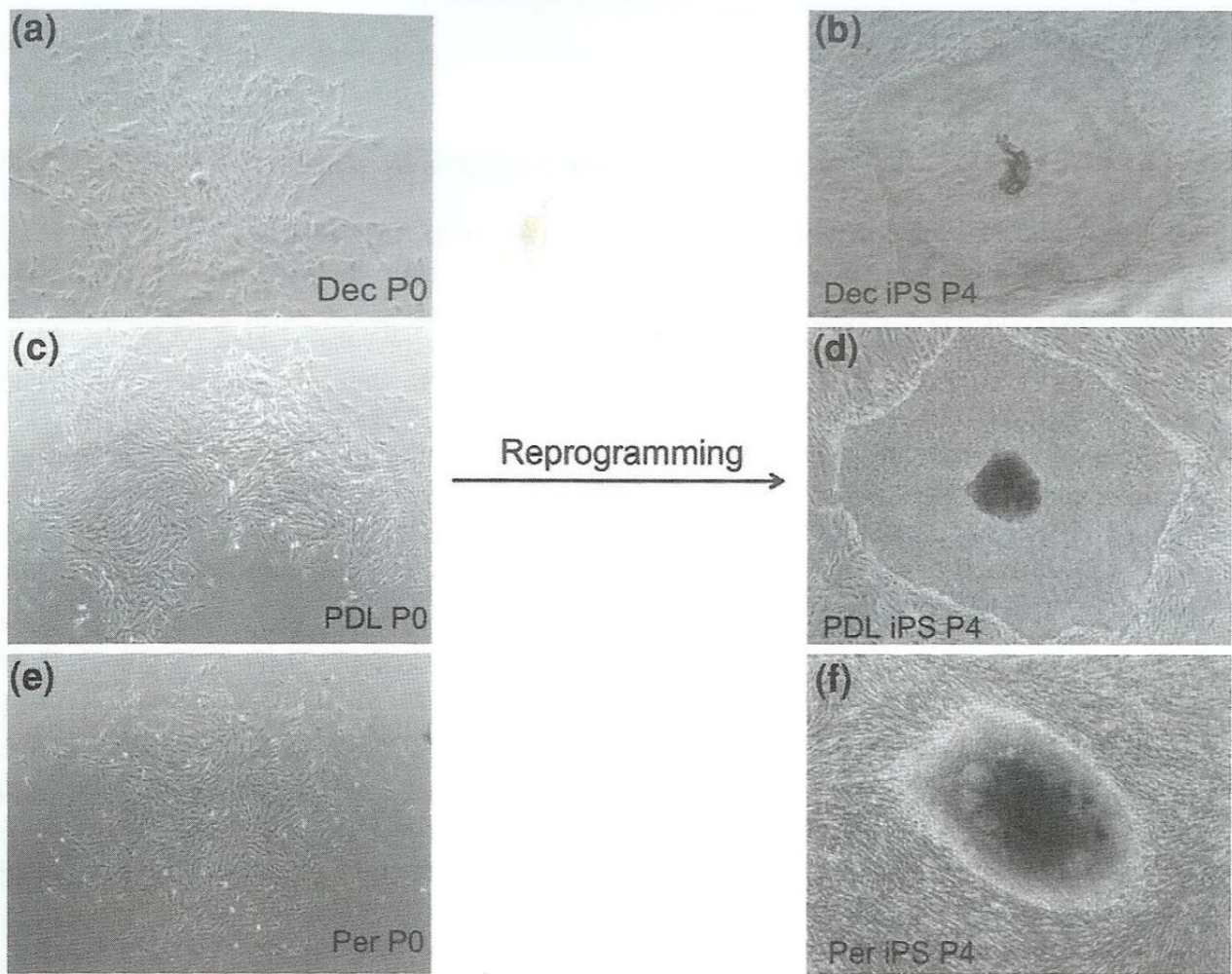


Fig. 7.7 Reprogramming of highly clonogenic stem cells derived from (a) deciduous dental pulp (Dec), (c) periodontal ligament (PDL) belong to a permanent tooth, and (e) dental pulp from same permanent tooth (Per) gave iPSC colonies, which are morphologically different (b–f)

aimed at the identification of the earliest lineage precursors. For example, tooth and alveolar bone duo may serve as a model to search such a close differentiation pathways, since there are very closely specialized tissues in an anatomical localization. Those tissues are alveolar bone of jaws, periodontal ligament, cementum and dentin of the tooth root, which are secreted by closely related cells: osteoblasts, periodontal ligament fibroblasts, cementoblasts and odontoblasts, respectively (Fig. 7.6).

They are all mesenchymal in origin except odontoblasts which have neuroectodermal origin (Koussoulakou et al. 2009). Although those tissues display many functional and physiological differences, there are no specific markers available to identify their specificity. On the other hand mesenchymal stem cell properties of periodontal ligament and dental pulp cells are almost identical (Huang et al. 2009). Dental pulp stem cells show clear difference than the other mesenchymal originated umbilical cord stromal stem cells (Oktar et al. 2011). However the attempt to reprogram them to iPSC state showed varied phenotypes that can be moderated through passages (Fig. 7.7) (Yildirim, unpublished observation). It would be interesting to search if those morphological discrepancies reflect epigenetic status of different but closely related cellular origins, which arose.

References

- Aronofsky D (1998) Pi. USA: 84 minutes.
- Byrne JA et al (2007) Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 450(7169):497–502
- Colebrook C (2002) Understanding Deleuze. Allen and Unwin, Crows Nest
- Corning PA (2002) The re-emergence of “emergence”: a venerable concept in search of a theory. *Complexity* 7(6):18–30
- Goodwin B (1996) How the leopard changed its spots. Touchstone Book, New York
- Hemberger M et al (2009) Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington’s canal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(8):526–537
- Hochedlinger K, Plath K (2009) Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 136(4):509–523
- Hoffman J (2010) Benoît Mandelbrot, Novel mathematician, Dies at 85. *New York Times* A28.
- Huang S (2004) Back to the biology in systems biology: what can we learn from biomolecular networks? *Brief Funct Genomic Proteomic* 2(4):279–297
- Huang S (2009) Reprogramming cell fates: reconciling rarity with robustness. *Bioessays* 31(5):546–560
- Huang S (2011) Systems biology of stem cells: three useful perspectives to help overcome the paradigm of linear pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2247–2259
- Huang S, Wikswo J (2006) Dimensions of systems biology. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 157:81–104
- Huang GT et al (2009) Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res* 88(9):792–806
- Ingold T (1990) An anthropologist looks at biology. *Man (NS)* 25:208–229
- Kauffman S (1969) Homeostasis and differentiation in random genetic control networks. *Nature* 224(5215):177–178
- Kauffman SA (1993) Self-organization and adaptation in complex system. Oxford University Press, New York
- Koussoulakou DS et al (2009) A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *Int J Biol Sci* 5(3):226–243
- Lederman L, Teresi D (1993) The god particle if the universe Is the answer, what is the question?. Dell Publishing, New York
- Oktar PA et al (2011) Continual expression throughout the cell cycle and downregulation upon adipogenic differentiation makes nucleostemin a vital human MSC proliferation marker. *Stem Cell Rev* 7(2):413–424
- Saha K, Jaenisch R (2009) Technical challenges in using human induced pluripotent stem cells to model disease. *Cell Stem Cell* 5(6):584–595
- Slack JM (2002) Conrad Hal Waddington: the last renaissance biologist? *Nat Rev Genet* 3(11):889–895
- Softologyblog (2011) Archive for the ‘Fractals’ category. <http://softologyblog.wordpress.com/category/fractals/>
- Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663–676
- Waddington C (1957) The strategy of genes. George Allen & Unwin, London
- Waddington CH (1959) Canalization of development and genetic assimilation of acquired characters. *Nature* 183(4676):1654–1655
- Waddington CH, Robertson E (1966) Selection for developmental canalisation. *Genet Res* 7(3):303–312
- Wilmot I et al (2011) The evolving biology of cell reprogramming. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 366(1575):2183–2197
- Ying QL et al (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453(7194):519–523

Chapter 8

Conclusion

Reprogramming technology surprised many cell biologists at the beginning. iPSCs caused a real U turn in cell biology; cells can be reprogrammed into their embryonic states whenever you need. The techniques are evolved enormously fast and today there are tremendous investments to develop robust and sensitive ways to generate ideal pluripotent cells. However, for obtaining the pluripotent lines, their subsequent differentiation and characterization, validated techniques and reagents in order to achieve high quality and safe progenitor cells must be conducted under controlled conditions. While those processes are helping a lot to solve the biggest problem of medicine, they are also pushing minds to think more deeply about health vs. illness. Yet, iPSCs would have profound implications for both basic research and clinical therapeutics by providing a patient-specific model system to study the pathogenesis of disease and test the effectiveness of pharmacological agents, as well as by providing ample source of autologous cells that could be used for transplantation.

About the Author

Sibel Yildirim is an associate professor at the Faculty of Dentistry, Department of Pediatric Dentistry, University of Selcuk, Konya, Turkey. She has been lecturer and practising dentistry at the university for years. She and her colleagues have established the first multi-disciplinary, dental/oral research centre in Turkey. She has authored many papers in international journals and has completed several research projects. Along with her pediatric dentistry PhD, she has also her second PhD on histology and embryology. Her research interests include the role of cytokines on deciduous tooth resorption, the viral ethiopathogenesis of pulpal/periapical diseases of deciduous teeth and vital pulpal therapies using recombinant human proteins or gene therapy. Accordingly, she has led some experiments on deciduous tooth pulp tissue and her team obtained important results showing high regulatory capacity of dental pulp cells on the events of deciduous tooth resorption or retention.

She had a chance to study with the indisputable leaders in the dental engineering field in Japan, Switzerland and the United States. She has become an expert in stem cells from the pulp tissue of deciduous and permanent teeth. She and her colleagues showed that dental pulp tissue stem cells have some clear differences than mesenchymal stem cells obtained from umbilical cord stroma. In addition to her dental tissue engineering studies she has pursued re-programming experiments in Geneva. In this part of her studies, she tried to generate the induced pluripotent stem cells (iPSCs) from deciduous vs. permanent dental pulp stem cells, as well as periodontal ligament cells and oral keratinocytes. She could observe that stem cells that have dental origin displayed strong potential for reprogramming. She believes comprehensively that isolating epithelial and mesenchymal stem cells from deciduous teeth and turning them to iPSCs will point toward novel venues for in situ restoration of dental tissue repair.

As a pediatric dentist, histologist and embryologist, she does believe that she has really powerful tool for understanding cell biology. After long years of experience in academic fields in three different continents she found herself that she became a student again who is keen to reach beyond the traditional boundaries

of biology. After she read Sui Huang's and Stuart Kaufman's marvelous manuscripts, she convinced totally that biocomplexity is the only field that helps to achieve her goals; moving one step closer to understanding life.

Index

A

Attractor, 61–63

C

Complexity, 59, 60, 62, 68

D

Different pluripotent cells, 5, 6

Differentiation, 1, 2, 7, 24, 42

Disease in a dish, 33

Disease modeling, 42

Disease-specific iPS cells, 34, 40

E

Embryonic stem cells, 1, 5

ESC, 2, 8, 9, 11, 23, 27, 28, 33, 40, 43,
51–53

Epigenetic modifications, 26, 27, 54

F

Factor induced reprogramming, 21

G

Gene regulatory network, 43, 63, 64

I

Induced pluripotent stem cells, 1, 11, 15

iPSC, 51–53, 67

Integration free reprogramming, 14, 18, 30, 40,
41, 51, 53, 62, 65

P

Pluripotency, 2, 5–9, 11, 12, 21–24

Pluripotent cells, 2, 5–7, 9, 15, 25, 27, 28, 33,
53, 68, 71

R

Reprogramming, 23–28, 39, 40, 42, 51–53,
59–62, 65, 66, 68, 71

S

Similarities and differences between iPSCs
and ESCs, 27

State space, 63, 64

Stem cells, 33, 39, 43, 53, 54, 57, 65, 67

Steps in reprogramming, 21

System biology, 62, 64

T

Transdifferentiation, 16, 53, 54

Índice de Siglas /Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFP	Alfa fetoproteína
AP	Fosfatase alcalina
ATR-X	Alfa Talassémia Retardium Síndrome
bFGF	Fator de crescimento básico dos fibroblastos
BMP	Proteína morfogenética óssea
CDKN2A	Inibidor de cinases dependentes de ciclinas 2A
CEE	Células estaminais embrionárias
CEPi	Células estaminais pluripotentes induzidas
CGP	Células germinativas primordiais
DEcH	Doença do enxerto contra hospedeiro
DGP	Diagnóstico Genético Pré-Implantação
EGCs	Células germinativas embrionárias
EpiSCs	Células estaminais do epissoma
FGF	Fator de crescimento dos fibroblastos
GDF3	Fator de crescimento e diferenciação 3
GFAP	Proteína glial fibrilar ácida (GFAP)
GSCs	Células estaminais germinativas
GSK3	Cínase-3 da síntese do glicogénio
HDAC	Histona deacetilases
hECSs	Células estaminais embrionárias humanas
HLA	Antigénios de leucócitos humanos
Klf	Kruppel-like factor
LIF	Fator de inibição da leucemia
LRH-1	Recetor homólogo do fígado -1
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MCI	Massa celular interna
MEF	Fibroblastos embrionários de ratinho
mESCs	Células estaminais embrionárias de ratinhos
MHC	Complexo de histocompatibilidade major
MSC	Células estaminais mesenquimais
NT	Transferência nuclear
OPERA	Oscillation Project with Emulsion-tRacking Apparatus
PcG	Proteínas do grupo Polycomb
PCR	Reação de polimerização em cadeia
RFLP	Polimorfismo do tamanho dos fragmentos de restrição
RISC	Complexo Silenciador Induzido pelo RNA
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SSEA	Antígenos Embrionários Estágio-Específicos
TEM	Transição epitelial-mesenquimal
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNCS	Transferência nuclear de células somáticas
VPA	Ácido valproico
α -SMA	Alpha-actina de músculo liso