



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Aplicación de las células troncales en la
investigación farmacéutica y desarrollo de
nuevos fármacos”**

TRABAJO ESCRITO VÍA EDUCACIÓN CONTINUA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

EUNICE GUTIÉRREZ AVILA



MÉXICO, D. F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesora: Marisol López López

VOCAL: Profesora: Alicia Beatriz Cervantes Peredo

SECRETARIO: Profesora: Natllely García Carreño

1er. SUPLENTE: Profesora: Lilia Angélica Bernal Gracida

2° SUPLENTE: Profesor: Carlos Pérez Muñoz

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA: M. en C. Natllely García Carreño

SUSTENTANTE: Eunice Gutiérrez Avila

ÍNDICE GENERAL

	Página
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
Capítulo 1. Generalidades de las células troncales	3
1.1 Definición de célula troncal	3
1.2 Clasificación de las células troncales	3
1.2.1 Células troncales totipotenciales	4
1.2.2 Células troncales pluripotenciales	5
1.2.3 Células troncales multipotenciales	7
1.3 Propiedades de las células troncales	10
1.3.1 Autorrenovación	10
1.3.2 Potencial de diferenciación	12
1.3.3 Plasticidad	12
1.4 Nicho celular	13
1.5 Obtención de las células troncales	14
1.6 Vías y factores que regulan la autorrenovación y pluripotencialidad de las células troncales	16
1.6.1 Determinación de la pluripotencialidad de las células troncales	20
1.7 Células troncales pluripotenciales inducidas	21
Capítulo 2. Investigación y desarrollo de nuevos fármacos y medicamentos	28
2.1 Proceso de investigación y desarrollo de un nuevo medicamento	29
2.1.1 Pre-desarrollo	29
2.1.2 Desarrollo preclínico	29
2.1.3 Desarrollo clínico	31

2.2 Retos de la industria farmacéutica durante el proceso de investigación y desarrollo de nuevos fármacos y medicamentos	32
---	----

Capítulo 3. Aplicaciones de las células troncales pluripotenciales en la investigación farmacéutica y desarrollo de nuevos fármacos	37
--	-----------

3.1 Modelado de enfermedades	41
------------------------------------	----

3.1.1 Las células troncales pluripotenciales inducidas como modelo <i>in vitro</i> para las enfermedades neurológicas	42
---	----

3.1.2 Las células troncales pluripotenciales inducidas como modelo <i>in vitro</i> para las enfermedades cardiovasculares	46
---	----

3.1.3 Las células troncales pluripotenciales inducidas como modelo <i>in vitro</i> para las enfermedades pancreáticas	47
---	----

3.1.4 Las células troncales pluripotenciales inducidas como modelo <i>in vitro</i> para las enfermedades hepáticas	48
--	----

3.2 Ensayos toxicológicos	49
---------------------------------	----

3.3 Cribado de alto rendimiento de fármacos y medicamentos (<i>High-throughput screening</i>)	53
---	----

3.4 Las compañías farmacéuticas y la implementación de la tecnología de las células troncales.....	54
--	----

CONCLUSIONES	56
---------------------------	-----------

REFERENCIAS	57
--------------------------	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Clasificación de las células troncales	4
Figura 2. Células troncales pluripotenciales	7
Figura 3. Linajes celulares derivados de las capas embrionarias	9
Figura 4. Estrategias de autorrenovación de las células troncales	11
Figura 5. Plasticidad celular	13
Figura 6. Métodos para la reprogramación nuclear de las células somáticas	23
Figura 7. Aplicaciones de las células troncales pluripotenciales inducidas	27
Figura 8. Investigación y desarrollo de un nuevo medicamento	28
Figura 9. Sometimientos y aprobaciones de las nuevas entidades moleculares en el periodo 2003-2012	33
Figura 10. Tasa de éxito de las nuevas entidades moleculares por fase	34
Figura 11. Aplicaciones de las células troncales pluripotenciales inducidas en el descubrimiento de nuevos fármacos y medicamentos	40
Figura 12. Empleo de las células troncales pluripotenciales inducidas para el modelado <i>in vitro</i> del Síndrome de Rett	44
Figura 13. Clasificación poblacional de las células troncales pluripotenciales inducidas.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Ejemplos de células troncales embrionarias-tipo	6
Tabla 2. Localización de nichos celulares	14
Tabla 3. Factores extrínsecos que regulan la pluripotencialidad.....	17
Tabla 4. Factores de transcripción que regulan la pluripotencialidad	19
Tabla 5. Ejemplos de la tecnología de las células troncales en la industria farmacéutica	55

ABREVIATURAS

AME	Atrofia muscular espinal
AMP	Adenosin monofostato
APP	Proteína precursora amiloide, del inglés, <i>Amyloid protein precursor</i>)
ATP7B	ATPasa transportadora de cobre beta
BMP	Proteína morfogénica del hueso, del inglés, <i>Bone morphogenetic protein</i>
BPC	Buenas Prácticas Clínicas
BRAF	Homólogo B1 del oncogén viral del sarcoma murino v-raf, del inglés <i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
c-MYC	Homólogo del oncogén viral de la melocitomatosis aviar, del inglés, <i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
c-Myc	Homólogo del oncogén viral de la melocitomatosis aviar, del inglés, <i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (Mus musculus)</i>
CAG	Citosina/Adenina/Guanina
CT	Célula troncal
CTA	Célula troncal adulta
CTCE	Célula troncal de carcinoma embrionario
CTE	Célula troncal embrionaria
CTE-tipo	Célula troncal embrionaria-tipo
CTF	Célula troncal fetal
CTGE	Célula troncal germinal embrionaria
CTH	Célula troncal hematopoyética
CTPi	Célula troncal pluripotencial inducida
CTTE	Célula troncal tejido-específica
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DNA	Acido desoxirribonucleico, del inglés <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EA	Enfermedad de Alzheimer
EH	Enfermedad de Huntington

EP	Enfermedad de Parkinson
EpiCT	Célula troncal epiblastica
FACS	Sorteo celular activado por fluorescencia, del inglés, <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FDA	Agencia de alimentos y medicamentos, del inglés, <i>Food and Drug Administration</i>
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2, del inglés <i>Fibroblast Growth Factor-2</i>
G6PC	Subunidad catalítica de la glucosa-6-fosfatasa, del inglés, <i>Glucose-6-phosphatase, catalytic subunit</i>
GDF	Factor de crecimiento y diferenciación, del inglés, <i>Growth and differentiation factor</i>
HTT	Huntingtina del inglés, <i>Huntingtin</i>
I+D	Investigación y desarrollo
IGF	Factor de crecimiento similar a la insulina, del inglés, <i>Insuline-like Growth Factor</i>
IGF1	Factor de crecimiento insulínico tipo 1, del inglés, <i>Insuline-like Growth Factor 1</i>
JAK	Cinasa de Janus, del inglés, <i>Janus kinase</i>
KCNQ1	Canal de potasio dependiente de voltaje de la subfamilia similar a KQT, del inglés, <i>KQT-like voltage-gated potassium channel-1</i>
Klf4	Factor de tipo Kruppel 4, del inglés, <i>Kruppel-like factor 4 (Mus musculus)</i>
KLF4	Factor de tipo Kruppel 4, del inglés, <i>Kruppel-like factor 4</i>
LDLR	Receptor de lipoproteína de baja densidad, del inglés, <i>Low Density Lipoprotein Receptor</i>
LEOPARD	Acrónimo conformado por: Léntigos, Anomalías del electrocardiograma, Hipertelorismo ocular, Estenosis pulmonar, Anomalías genitales, Retraso del crecimiento, Sordera; del inglés, <i>Lentigines, Electrocardiographic abnormalities, Ocular hypertelorism, Pulmonary valve stenosis, Abnormal genitalic, Retardation of growth, Deafness</i>)
LIF	Factor inhibidor de la leucemia, del inglés, <i>Leukemia Inhibitor Factor</i>

LIN28	Proteína LIN28 de unión a RNA
Lin28	Proteína LIN28 de unión a RNA (<i>Mus musculus</i>)
lpm	Latidos por minuto
LRKK2	Cinasa 2 con repeticiones ricas en leucina, del inglés, <i>Leucine-rich repeat kinase 2</i>
MACS	Selección celular por campos magnéticos, del inglés, <i>Magnetic-activated cell sorting</i>
maCTG	Célula troncal adulta germinal multipotencial
MAPC	Célula progenitora multipotencial adulta, del inglés, <i>Multipotent adult progenitor cell</i>
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno, del inglés, <i>Mitogen activated protein kinase</i>
MASC	Célula troncal multipotencial adulta, del inglés, <i>Multipotent adult stem cell</i>
MCI	Masa celular interna
mCTG	Célula troncal germinal multipotencial
MECP2	Proteína 2 de unión a metil-CpG, del inglés, <i>Methyl CpG binding protein 2</i>
MIAMI	Célula inducible de multilineaje adulta aislada de médula ósea, del inglés, <i>Marrow Isolated Adult Multilineage Inducible</i>
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensajero
Nanog	Proteína de homeodominio Nanog (<i>Mus musculus</i>)
NANOG	Proteína de homeodominio NANOG
ND	No determinado
NEM	Nueva entidad molecular
NMI	Nuevo medicamento en investigación
NOB	Diabético no obeso, del inglés, <i>Non-obese diabetic</i>
NOD	Ratón diabético no obeso, del inglés, <i>Non-obese diabetic</i>
NRG1	Neurregulina 1, del inglés, <i>Neuregulin 1</i>

Oct-4	Proteína 4 de unión al octámero, del inglés, <i>Octamer-binding protein 4 (Mus musculus)</i>
OCT-4	Proteína 4 de unión al octámero, del inglés, <i>Octamer-binding protein 4 (</i>
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas, del inglés, <i>Platelet derived growth factor</i>
PI3K	Fosfoinositol 3-cinasa, del inglés, <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>
PTPN11	Proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 11, del inglés, <i>Protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 11</i>
POU5F1	Factor de transcripción 1 clase 5 que contiene un dominio POU, del inglés, <i>POU class homeobox 1</i>
PS1	Presinilina 1, del inglés, <i>Presinilin 1</i>
PS2	Presinilina 2, del inglés, <i>Presinilin 1</i>
PSD95	Proteína de densidad post-sináptica 95, del inglés, <i>postsynaptic density protein 95</i>
PTPN11	Proteína tirosina fosfatasa no receptora tipo 11, del inglés, <i>Protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 11</i>
RAF1	Homólogo 1 del oncogén viral del sarcoma murino v-raf, del inglés, <i>V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RAS	Sarcoma de rata, del inglés, <i>Rat sarcoma</i>
RNA	Ácido ribonucleico, del inglés, <i>Ribonucleic acid</i>
RTK	Receptor tirosina cinasa, del inglés, <i>Receptor tyrosine kinase</i>
S1P	Esfingosina 1-fosfato, del inglés, <i>Sphingosine-1-phosphate</i>
SERPINA1	Inhibidor de la peptidasa tipo serina clase A miembro 1, del inglés, <i>Serpin Peptidase Inhibitor, Clade A, Member 1</i>
SMN1	Proteína de supervivencia de las neuronas motoras 1, del inglés, <i>Survival motor neuron 1</i>
SMN2	Proteína de supervivencia de las neuronas motoras 2, del inglés, <i>Survival motor neuron 2</i>
Sox2	Proteína perteneciente a la familia con cajas HMG relacionada con SRY, del inglés, <i>SRY (sex determining region Y)-box 2 (Mus musculus)</i>
SOX2	Proteína perteneciente a la familia con cajas HMG relacionada con SRY, del inglés, <i>SRY (sex determining region Y)-box 2</i>

SQTL	Síndrome del QT largo
SSEA-1	Antígeno embrionario de estado específico 1, del inglés, <i>Stage-specific embryonic antigen 1</i>
SSEA-3	Antígeno embrionario de estado específico 3, del inglés, <i>Stage-specific embryonic antigen 3</i>
SSEA-4	Antígeno embrionario de estado específico 4, del inglés, <i>Stage-specific embryonic antigen 4</i>
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción, del inglés, <i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β , del inglés, <i>Transforming growth factor β</i>
TNCS	Transferencia nuclear de células somáticas
TRA-1-60	Antígeno de rechazo tumoral 1-60, del inglés, <i>Tumor rejection antigen 1-60</i>
TRA-1-80	Antígeno de rechazo tumoral 1-80, del inglés, <i>Tumor rejection antigen 1-80</i>
VSEL	Células troncales pequeñas parecidas a células embrionarias, del inglés, <i>Very small embryonic like</i>
WNT o Wnt	<i>Wingless</i>

INTRODUCCIÓN

La industria farmacéutica es un elemento importante dentro de los sistemas de salud de todo el mundo y es una de las principales fuentes de innovación en cuanto al desarrollo, fabricación y comercialización de nuevos medicamentos. La innovación y éxito de la industria farmacéutica depende altamente de la implementación de programas estratégicos de investigación y desarrollo (I+D) que tengan como principal objetivo generar y extender el conocimiento científico y aplicarlo al descubrimiento de nuevos fármacos y medicamentos.

El proceso de investigación y desarrollo de nuevos medicamentos es largo, complejo y costoso; y está lleno de retos constantes. El principal problema de la industria farmacéutica es el estancamiento y disminución en la productividad de nuevas entidades moleculares o medicamentos, los cuales son eliminados o excluidos del proceso de I+D o del mercado, por problemas asociados a su eficacia y seguridad.

La causa principal de las limitaciones del proceso de I+D de nuevos medicamentos, y por ende de la eliminación de las moléculas, es que no se cuenta con modelos de estudio tanto *in vitro* como *in vivo* durante las fases tempranas del desarrollo (predesarrollo y preclínica) que posean un genotipo y fenotipo adecuado para representar las patologías humanas y evaluar el comportamiento de su exposición ante distintos compuestos con actividad farmacológica, comprometiendo así la eficacia y seguridad del medicamento innovador durante las distintas fases clínicas del proceso de I+D.

Es por ello que la industria farmacéutica debe incursionar en la evaluación e implementación de nuevas tecnologías que afecten positivamente la eficiencia del descubrimiento de nuevos fármacos y medicamentos. Un gran paso en esta dirección ha sido el descubrimiento de las células troncales, seguido del aislamiento de las células troncales embrionarias, que son células pluripotenciales con la capacidad de autorrenovarse indefinidamente y producir cualquier linaje celular que conforma un organismo, y más recientemente la generación de células troncales pluripotenciales inducidas a partir de la reprogramación nuclear de células totalmente diferenciadas. Por lo que, la tecnología de las células troncales hace posible la producción de cualquier linaje celular y, aun más importante, la generación de líneas

celulares derivadas de pacientes, lo que representa una plataforma única para el estudio de la patogénesis de las enfermedades humanas y la realización de pruebas farmacológicas y toxicológicas que deriven en el descubrimiento de nuevos medicamentos seguros y eficaces.

El siguiente trabajo tiene como objeto presentar una revisión bibliográfica actualizada sobre las generalidades de las células troncales con énfasis en las células troncales pluripotenciales inducidas, presentándolas como una herramienta innovadora y totalmente prometedora en el modelado de enfermedades, descubrimiento de fármacos y evaluación de los perfiles de seguridad y eficacia.

MARCO TEÓRICO

Capítulo 1. Generalidades de las células troncales

1. 1 Definición de célula troncal

Las células troncales (CT), denominadas en inglés *stem cells*, son precursores celulares “indiferenciados” que tienen la capacidad de renovarse a si mismas mediante divisiones mitóticas generando CT hijas que conservan su potencial de desarrollo y proliferación idéntico, favoreciendo así la estabilidad de su población durante toda la vida del organismo. Asimismo, cuando una CT se divide, su progenie, bajo condiciones fisiológicas o experimentales específicas, tiene el potencial de diferenciarse en al menos un tipo celular con funciones más especializadas; por ejemplo, una neurona, una célula de la piel o un glóbulo rojo; lo que permite reparar o regenerar los tejidos desgastados y dañados del cuerpo a través del tiempo y la enfermedad. Una CT también se distingue por modular y balancear las características previamente mencionadas de acuerdo a las estímulos ambientales y sus limitaciones genéticas [1, 2, 3, 4, 5].

1.2 Clasificación de las células troncales

Las CT se clasifican de acuerdo al tipo de células diferenciadas a que puede dar lugar su progenie. Esto depende en gran manera de su localización y del estado del desarrollo de los organismos de los que se aíslan, es decir, de su origen [6].

El potencial de diferenciación decrece conforme se avanza en el desarrollo, por lo que las CT aisladas de estadios más tempranos pueden generar más tipos celulares que las CT aisladas de estadios más tardíos. Así, se pueden clasificar a las CT conforme a su potencial de diferenciación en: totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales (Fig. 1) [6].

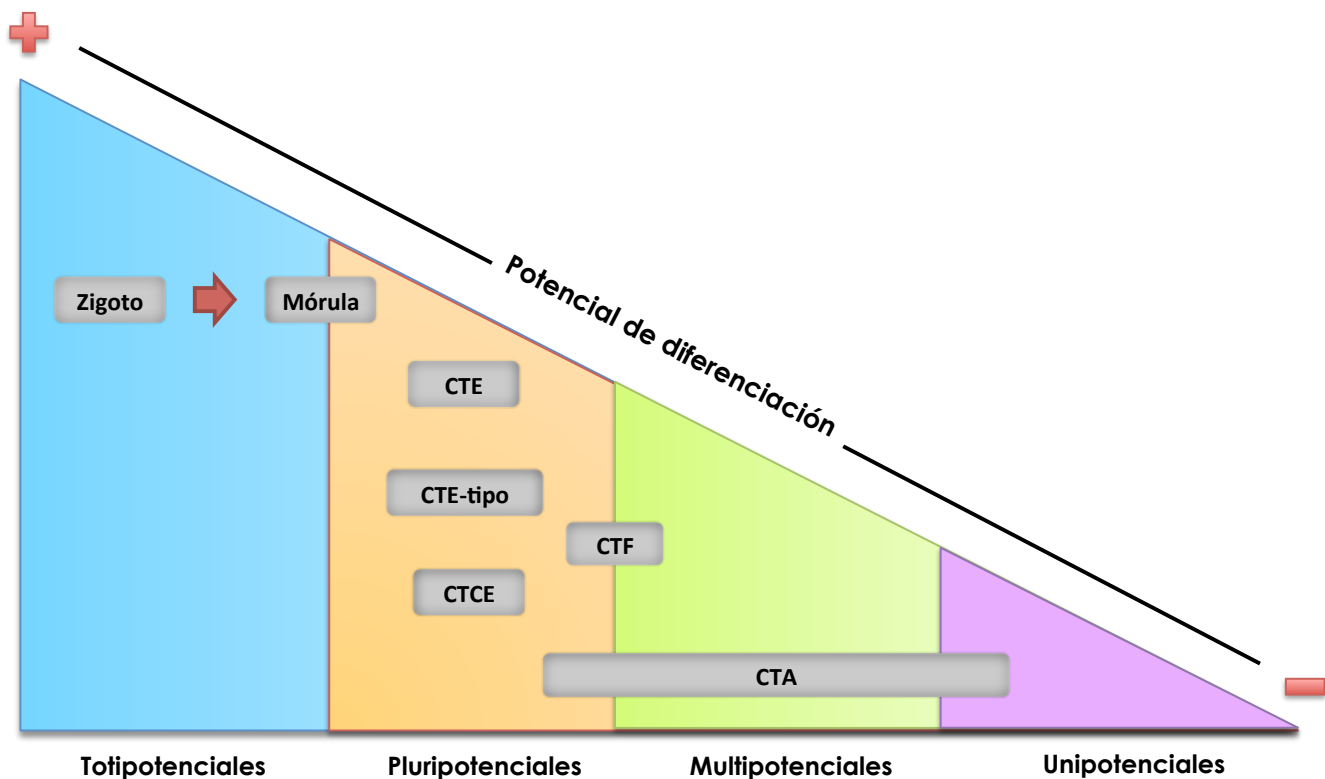


Figura 1. Clasificación de las células troncales. Las CT se clasifican de acuerdo a su potencial de diferenciación el cual está íntimamente relacionado con el origen de la misma. CTE = Célula troncal embrionaria, CTE-tipo = Célula troncal embrionaria-tipo, CTCE = Célula troncal de carcinoma embrionario, CTF = Células troncales fetal, CTA = Célula troncal adulta.

1.2.1 Células troncales totipotenciales

Las CT totipotenciales son aquellas que tienen la capacidad de producir cualquier linaje celular embrionario y extraembrionario, y por tanto dar origen a un nuevo organismo. En los mamíferos, sólo el cigoto y las primeras células resultantes de su segmentación hasta la fase de mórula son totipotenciales [7].

El cigoto es la primera célula que se produce tras el evento de fertilización entre el espermatozoide y óvulo. Conforme el cigoto se desplaza por las trompas de Falopio rumbo a su implantación en el útero sufre las primeras divisiones aumentando así el número de

células a las cuales se les denomina blastómeros. La constante división de los blastómeros termina formando un cúmulo de ellos (12-16 blastómeros) que se denomina mórula [8].

1.2.2 Células troncales pluripotenciales

Las **CT pluripotenciales** son capaces de generar cualquier linaje celular con excepción de los extraembrionarios, ya que sólo dan origen a los progenitores que forman cualquiera de las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo. Dentro de esta clasificación se encuentran las células troncales embrionarias (CTE), las células troncales embrionarias tipo (CTE-*tipo*) y las células troncales de carcinoma embrionario (CTCE) [6,9] (Fig.2).

Aproximadamente 4 días después de la fecundación, la mórula llega a la cavidad uterina y se forma el blastocelo por acumulación de líquido en su interior, lo que provoca que se separen los blastómeros en dos porciones: un conjunto central de blastómeros que constituyen la masa celular interna (MCI) y una capa celular externa y delgada denominada trofoblasto que da lugar a la placenta y otros tejidos para la implantación y posterior desarrollo del embrión en el útero; a estas dos estructuras conformadas por 50-150 células se le denomina blastocisto o blástula [8]. Las células aisladas de la masa celular interna del blastocisto son las CTE [6].

Las CTE-tipo comprenden a todas las CT con propiedades similares a las CTE que no han sido aisladas directamente de la MCI pero que han sido derivadas de las distintas etapas del desarrollo embrionario y fetal; así como de las células adultas que han sido reprogramadas por distintos métodos [9]. Algunos ejemplos de CTE-tipo se indican en la Tabla 1.

Las CTCE son aquellas que son aisladas de teratocarcinomas [21] que son tumores que se originan en las células germinales, por lo general en los testículos o los ovarios de los adultos jóvenes [22].

Tabla 1. Ejemplos de células troncales embrionarias-tipo

CTE-tipo	Descripción o fuente	Referencia
Células troncales epiblasticas (EpiCT)	Obtenidas del epiblasto del embrión post-implantación	[10, 11]
Células troncales germinales embrionarias (CTGE)	Derivadas de las células germinales primordiales que se encuentran en los tejidos gonadales del embrión	[12, 13, 14]
Células troncales germinales multipotenciales* (mCTG)	Obtenidas a partir del cultivo <i>in vitro</i> de las células troncales espermatogónicas prenatales aisladas del tejido testicular fetal	[15, 16, 18]
Células troncales adultas germinales multipotenciales* (maCTG)	Generadas a partir del cultivo <i>in vitro</i> de las células troncales espermatogónicas aisladas del tejido testicular adulto	[15, 16, 18]
Células troncales pluripotenciales inducidas (CTPi)	Derivadas de la reprogramación nuclear de las células adultas generalmente somáticas	[19, 20]

*Las células que adquieren un fenotipo similar a las CTE y por ende son pluripotenciales. Se denominan multipotenciales porque tienen la capacidad de generar células multipotenciales [15,16]

Conforme se avanza en el desarrollo embrionario, la células que conforman la MCI se segregan formando dos capas: el hipoblasto y el epiblasto; posteriormente, se inicia la gastrulación. Durante esta etapa las células comienzan a desarrollarse y especializarse hacia linajes específicos, siendo las células en etapas más tardías del desarrollo multipotenciales [8].

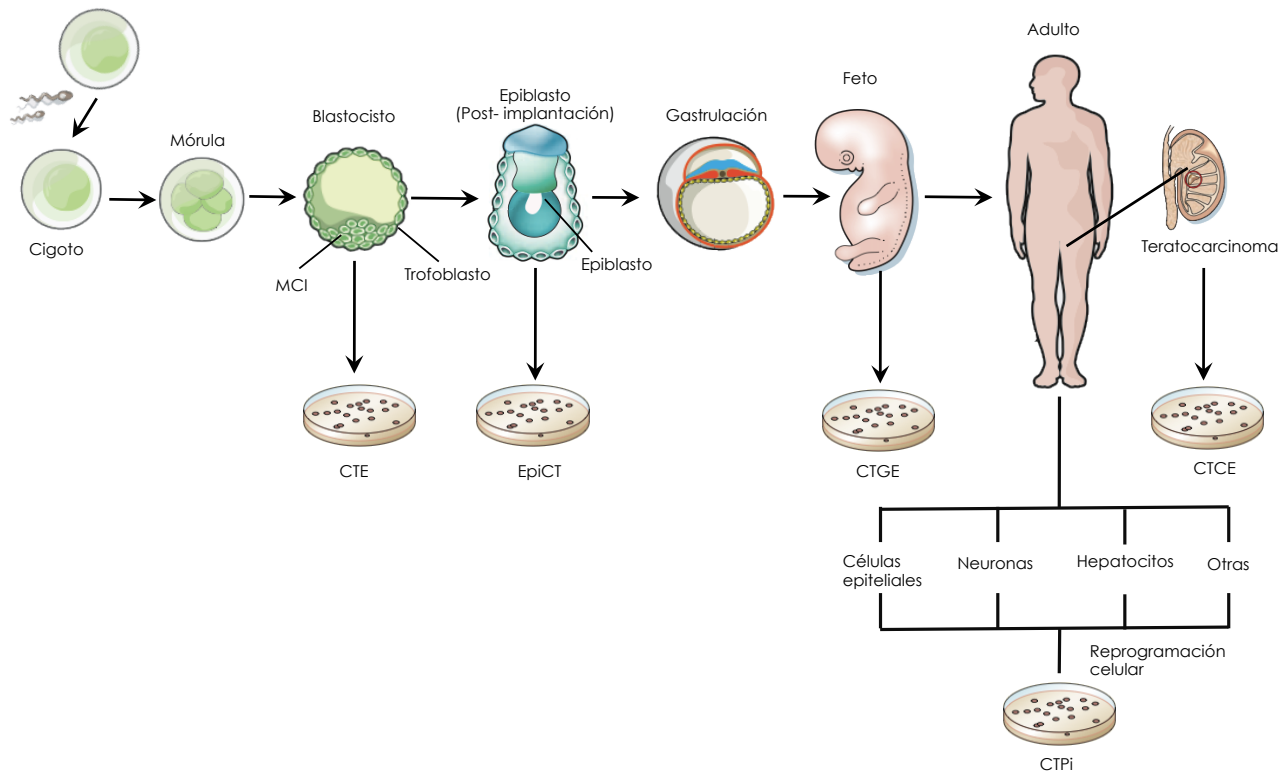


Figura 2. Células troncales pluripotenciales. Las células troncales pluripotenciales tienen la capacidad de autorrenovarse y generar cualquier linaje celular de un organismo adulto. Pueden ser aisladas de las distintas etapas del desarrollo embrionario o producirse. CTE = célula troncal embrionaria, EpiCT = Célula troncal epiblastica, CTGE = Célula troncal embrionaria germinal, CTCE = Célula troncal de carcinoma embrionario, CTPI = Célula troncal pluripotencial inducida

1.2.3 Células troncales multipotenciales

Las **CT multipotenciales** son células presentes en los tejidos u órganos embrionarios, fetales y adultos que tienen un mayor grado de diferenciación y una capacidad limitada para generar todos los linajes celulares. Sólo pueden dar origen a tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria, es decir, llevan la marca de un tejido concreto y por tanto sólo pueden dar lugar a tipos celulares del tejido al que pertenecen (órgano-específicas) [7]. Conforme a su origen se resaltan dos tipos de CT multipotenciales: fetales y adultas [27].

Las **células troncales fetales (CTF)** son células que se derivan propiamente del feto y de las estructuras de soporte extraembrionarias tales como: cordón umbilical, líquido amniótico, gelatina de Wharton, amnios y placenta [24,25]. Tienen un potencial de diferenciación más

limitado que las CTE y, en contraste con las células troncales adultas, su población, potencial de expansión y potencial de diferenciación son mayores, pues son menos maduras y más abundantes debido a su participación específica en la ontogenia prenatal [27].

Las **células troncales adultas (CTA)**, también conocidas como células troncales tejido-específicas (CTTE), son células progenitoras que se encuentran en un organismo desarrollado dentro de los órganos y tejidos adultos. Tienen la capacidad de autorrenovarse y de dar lugar a células completamente diferenciadas con fenotipos maduros y funcionales. Se encuentran en nichos específicos del estroma del tejido al que pertenecen y pertenecerá su progenie [26,27].

Las CTA se forman durante la ontogénesis y permanecen quiescentes hasta que un estímulo local, que modifique las condiciones físicas y químicas entre el nicho celular y la CTA, induzca su autorrenovación, diferenciación o proliferación [27].

La principal función de las CTA es actuar como un sistema de reparación para el cuerpo, reemplazan a las células que han muerto o han sido dañadas por una lesión o enfermedad; de este modo mantienen de forma normal el recambio celular de los tejidos, lo que permite asegurar su homeostasis [26,27].

Las CTA son poco comunes y se han encontrado en número escaso en la médula ósea, sangre periférica, músculo, tejido adiposo, tejido sinovial, periostio, intestinos, pulpa dental, cerebro, vasos sanguíneos, hígado, páncreas, córnea y testículos [26, 28].

A pesar de que las CTA se han señalado sólo como multipotenciales trabajos recientes han señalado la existencia de algunos tipos de CTA más primitivas con un potencial de diferenciación mayor denominadas CTA pluripotenciales y han sido aisladas de la médula ósea [29]. Las células que han sido caracterizadas son: i) Células progenitoras multipotenciales adultas (MAPC, del inglés *multipotent adult progenitor cells*) [30,31]; ii) Células inducibles de multilinaje adultas aisladas de médula ósea (MIAMI, del inglés *marrow isolated adult multilineage inducible*) [32]; iii) Células troncales multipotenciales adultas

(MASC, del inglés *multipotent adult stem cells*) [33]; iv) OmniCyte [34,35] y v) Células troncales pequeñas parecidas a células embrionarias (VSEL, del inglés, *very small embryonic like*) [36].

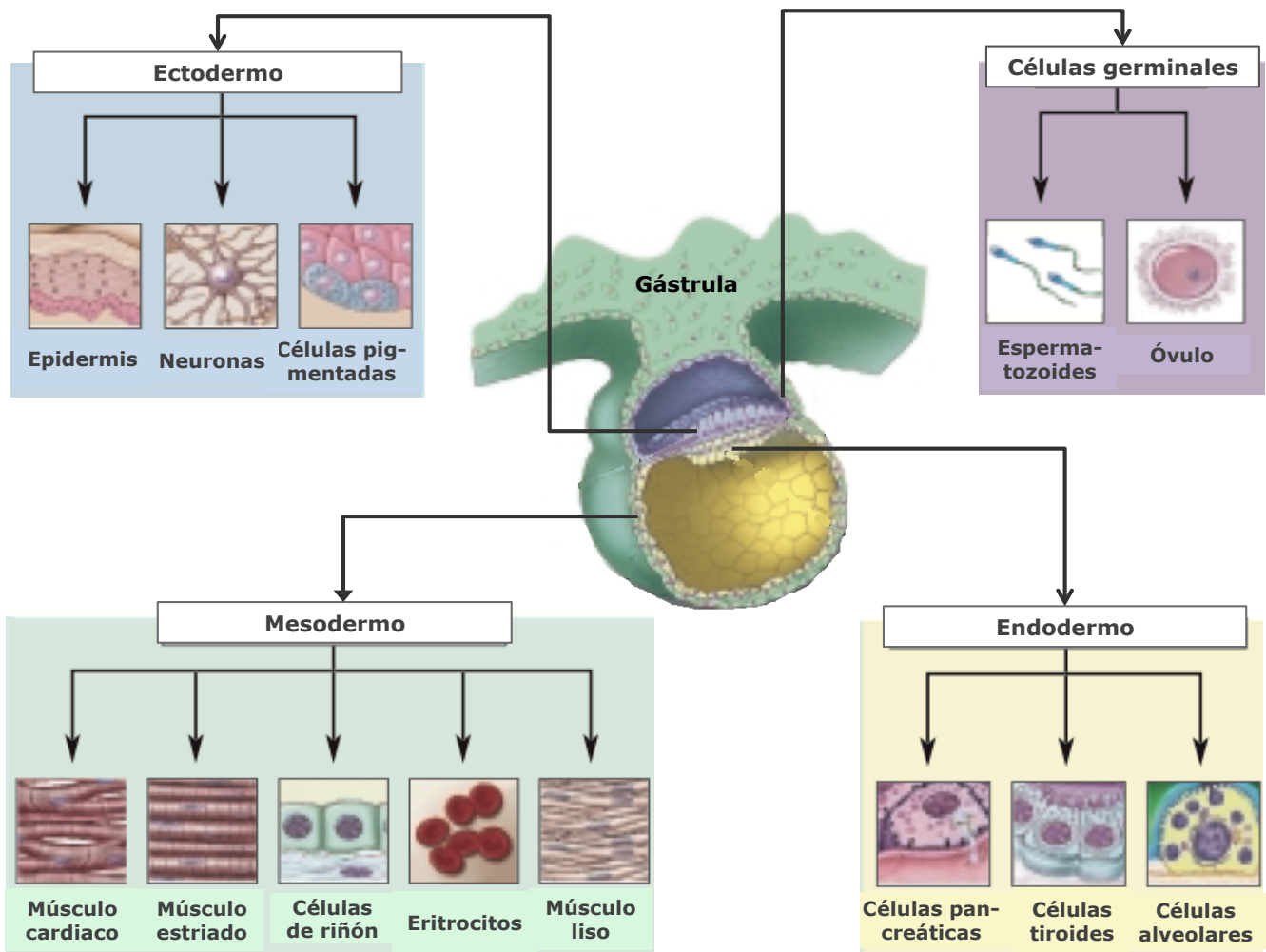


Figura 3. Linajes celulares derivados de las capas embrionarias. Tras el proceso de gastrulación, las capas embrionarias se diferencian y especializan dando lugar a la gran variedad de linajes celulares que conforman los diferentes órganos del cuerpo. Modificado de [41]

1.3. Propiedades de las células troncales

Todas las CT, independientemente de su origen, se diferencian de otros tipos celulares por dos características principales: su capacidad de auto-renovación y su potencial de diferenciación [2,4]. En los últimos años se ha resaltado una tercera característica que es su plasticidad [37].

1.3.1 Autorrenovación

La autorrenovación es el proceso por el cual una CT se divide para generar una o dos células hijas con el potencial de proliferación, expansión y diferenciación similar al de la célula progenitora; con el objetivo de tener un control dinámico de su población que le permita mantenerse tanto cualitativa como cuantitativamente estable a lo largo de la vida [2, 38].

Para las CT, la autorrenovación es esencial, ya que les permite expandir su número durante el desarrollo, mantenerse dentro de los tejidos adultos y restaurar su concentración tras una lesión [2].

La división de las CT puede ser simétrica o asimétrica. La división simétrica genera dos células hijas idénticas entre sí y a la célula progenitora expandiendo así la población de las CT. Si estas CT hijas son expuestas a señales específicas, pueden tener luego destinos diferentes. La generación de dos células hijas con un grado de diferenciación mayor con respecto a la célula progenitora también es un tipo de división simétrica. Como resultado de la división asimétrica se obtiene una célula hija con las mismas propiedades que su progenitora y otra, con un fenotipo diferente, es decir, más diferenciada. Este tipo de división es importante, ya que en una sola división hay autorrenovación y diferenciación pero, tiene como desventaja que las CT no pueden expandirse en número [2,39,40]. La mayoría de las CT presentan ambos tipos de división y el equilibrio entre estos dos modos es controlado por señales ambientales y características intrínsecas de la célula para producir un número adecuado de CT y células diferenciadas [2, 39].

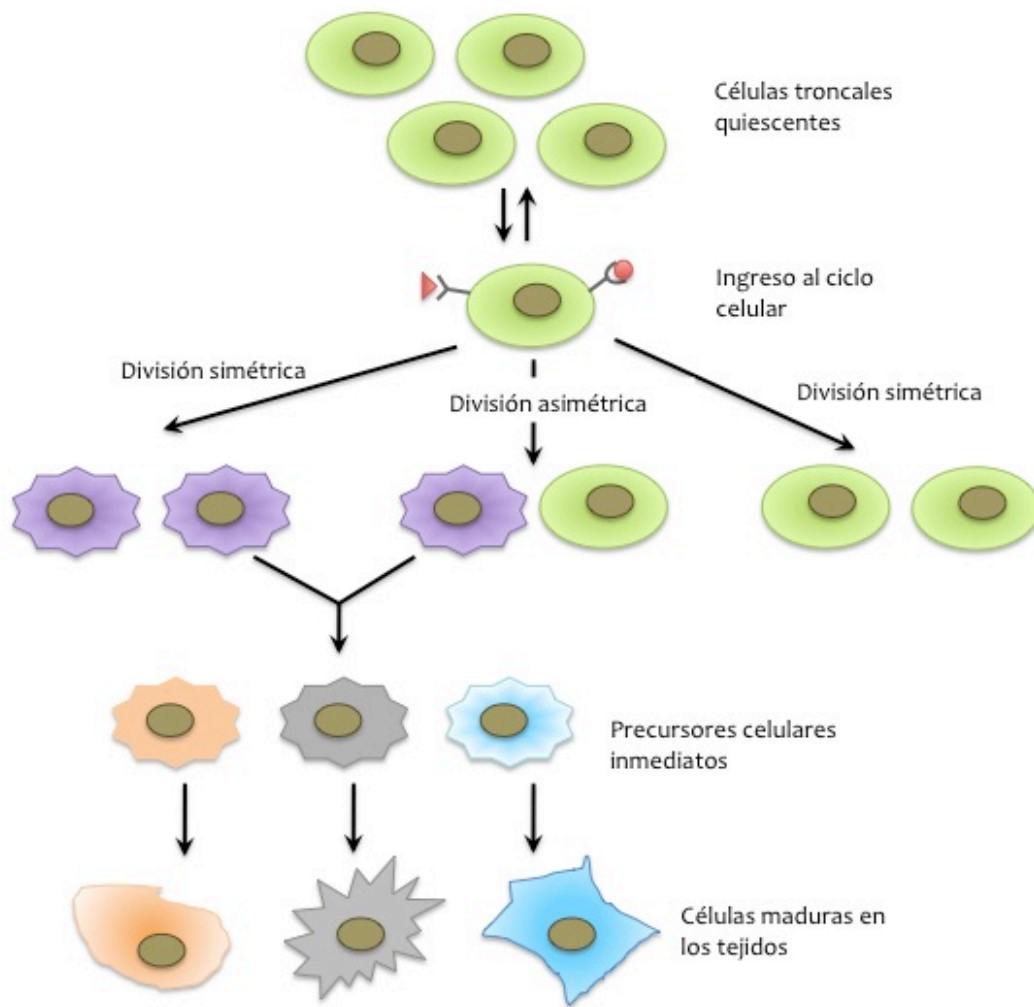


Figura 4. Estrategias de autorrenovación de las células troncales. Las células troncales tienen la capacidad de autorrenovarse mediante la división simétrica y asimétrica. Modificada de [27]

Cabe mencionar que la capacidad de autorrenovación no es única de las CT, algunos tipos de células progenitoras restringidas y células especializadas también presentan esta característica, como los progenitores de la glía y los linfocitos (42). A pesar de ello, el gran potencial de autorrenovación de las células CT permite diferenciarlas de aquellos progenitores restringidos con un potencial de autorrenovación limitado. Por otro lado, el potencial de autorrenovación de las CT dependerá de las condiciones fisiológicas o experimentales a las que se expongan así como del tipo de CT, por ejemplo las CTE tienen mayor potencial de autorrenovación y desarrollo que las CTA [39].

1.3.2 Potencial de diferenciación

Es la capacidad que tienen las CT para dar lugar a una progenie madura heterogénea, la cual se diversifica y especializa tanto estructural como funcionalmente conforme a un proceso jerárquico que implica la activación de mecanismos genéticos y epigenéticos a un tiempo y condiciones dadas [2, 38].

1.3.3 Plasticidad

Es la capacidad de ciertas CT de cruzar las barreras del linaje celular adoptando el perfil de expresión y el fenotipo funcional de las células que son típicos de otros tejidos, es decir, son capaces de generar grupos celulares distintos a los de su tejido de origen [37]. Un ejemplo de plasticidad se presenta en las células troncales hematopoyéticas (CTH), las cuales, pueden ser aisladas de la médula ósea, sangre periférica y cordón umbilical; su función es mantener la población de los linajes celulares que conforman la sangre y el sistema inmune. Distintos grupos de investigación han descrito que las CTH no sólo se diferencian en células hematopoyéticas sino también pueden hacerlo a células de músculo esquelético [99,100], músculo cardíaco [101,102], endotelio [103], neuroectodermo [104,105], células epiteliales [106], hepatocitos y células del epitelio gastrointestinal y pulmonar [106-108] (Fig. 5).

Cabe mencionar que la plasticidad no es específica sólo de las CT ya que ésta también se ha adjudicado a células completamente diferenciadas [62]. Como ejemplo, se menciona la conversión de fibroblastos de ratón a CTE-tipo (CTPi) [19] y a neuronas [109].

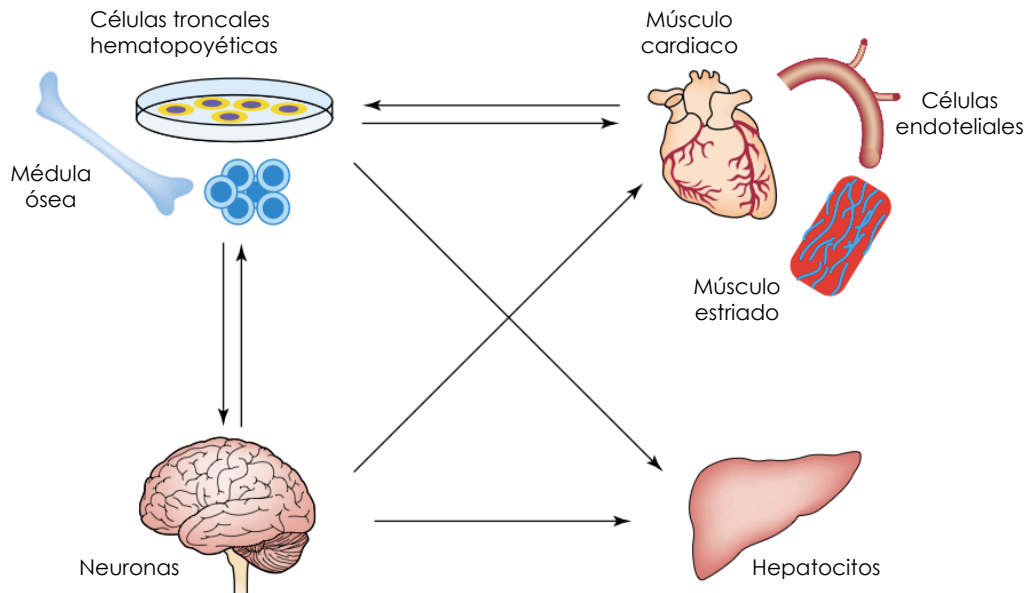


Figura 5. Plasticidad celular. Algunas CT tienen la capacidad de generar linajes celulares distintos al tejido de origen. Un ejemplo son las células troncales hematopoyéticas que pueden dar lugar a células endoteliales, músculo esquelético, músculo cardíaco o hepatocitos. Modificada de [37]

1.4. Nicho celular

Las poblaciones de CT se establecen en nichos celulares, que son ubicaciones anatómicas específicas que proporcionan un microambiente adecuado para el mantenimiento óptimo de las mismas y que las habilita de tal forma que puedan participar en la generación, mantenimiento y reparación de tejidos [98]. El nicho celular está formado por elementos celulares (e.g. células del sistema inmune y células estromales) y acelulares (e.g. citocinas, factores de crecimiento, moléculas de adhesión y iones) cuyas interacciones regulan la supervivencia, autorrenovación y diferenciación de las CT [169]. Asimismo, el nicho celular proporciona un refugio adecuado que secuestra a las CT de la exposición a estímulos que promuevan su diferenciación, apoptosis y cualquier otro estímulo que comprometa sus reservas. Aunque por otro lado, también provee de las señales necesarias para que las CT puedan diferenciarse hasta una célula madura a fin de cumplir con los requerimientos fisiológicos del tejido. Por lo tanto, una de las características principales del nicho celular es que mantiene un equilibrio entre la quiescencia y la actividad de las CT [98]. En la Tabla 2 se muestran diferentes tipos de CTA y la localización anatómica de sus nichos.

Tabla 2. Localización de nichos celulares

Tipo de CTA	Localización	Referencias
Neuronal	Hipocampo, región subventricular y bulbo olfatorio.	[110, 111]
Intestinal	En la cuarta o quinta posición de la parte inferior de las criptas intestinales por encima de las células de Paneth.	[112, 113]
Hepática	Conductos de Hering.	[114]
Epidérmica	Protuberancia del folículo piloso Estrato basal de la epidermis.	[115, 116]
Músculo-esqueléticas (células satélite)	Entre la membrana plasmática de la fibra muscular y la lámina basal.	[117,118]
Hematopoyéticas	Médula ósea: endostio y compartimento vascular.	[119]
Espermatogónicas	Lámina basal de los túbulos seminíferos.	[120,121]

1.5. Obtención de las células troncales

En el laboratorio las CTE humanas se obtienen mediante el aislamiento de la masa celular interna del blastocisto proveniente de embriones de preimplantación por diversos métodos como inmunocirugía [55] o disección con láser [56]. Algunas CTE humanas también han sido aisladas de la mórula [59] e incluso a partir del blastocisto en etapas tardías como es el caso de algunas de las CTE-tipo [60,10,11].

Ante las objeciones éticas, religiosas y culturales en cuanto al uso de embriones, se han desarrollado guías que regulan la investigación con CTE y establecen que éstas deben provenir de embriones sobrantes creados con fines de reproducción vía fertilización *in vitro*, donados bajo el consentimiento informado y sin ofrecimiento de incentivos financieros a los donantes [57, 58]; condiciones que también aplican para obtención de los gametos. Igualmente, establecen que los embriones producidos *in vitro* no podrán ser transferidos a un útero humano o no humano y que el cultivo de los mismos no debe exceder los 14 días o

hasta la formación de la línea primitiva, o bien, lo que ocurra primero [57].

Las CT también pueden ser obtenidas a partir de fetos abortados como es el caso de las CTGE, las cuales son aisladas de las células germinales primordiales que se encuentran en los tejidos gonadales de fetos en etapas tempranas [61].

Las CTF provenientes de los anexos embrionarios representan una fuente potencial ilimitada de CT, las cuales pueden ser recolectadas en cada nacimiento. Los anexos embrionarios como la placenta y el cordón umbilical son fáciles de procesar y almacenar, ya que una vez congelados son biológicamente estables. Aunado a ello, el método de recolección no es invasivo ni perjudicial para la madre ni para su hijo [62].

Las CTA han sido clasificadas de acuerdo a su tejido de origen y es precisamente el mismo del cual derivan (Tabla 2). Unos de los principales problemas para la obtención de las CTA es que se encuentran en pequeñas cantidades y que con frecuencia están localizadas en las partes más profundas de los tejidos, dificultando su aislamiento [26, 27], lo que conlleva a que los métodos de obtención de las mismas sean más invasivos. Aunado a esto, las CTA están rodeadas de millones de células ordinarias, por lo que existe una mayor dificultad para su identificación, aislamiento y purificación. Además, tras la obtención de las mismas se requiere de un análisis riguroso que permita caracterizar su multipotencialidad [44].

El método general para la obtención de las CTA consiste en digerir el tejido mecánicamente y posteriormente separarlas. Dependiendo de las propiedades de las CTA éstas pueden ser separadas empleando el sorteo celular activado por fluorescencia (FACS, por sus siglas en inglés, *Fluorescence-activated cell sorting*); selección celular por campos magnéticos (MACS, del inglés, *Magnetic-activated cell sorting*) o centrifugación por gradiente [63].

Las CTF de los anexos embrionarios y las CTA prometen ser excelentes herramientas para aplicaciones terapéuticas futuras, ya que evaden las preocupaciones éticas, religiosas y culturales que rodean al aislamiento de CT a partir de embriones y fetos, son de fácil acceso y se ha documentado su plasticidad [37]

Una fuente importante de CT pluripotenciales son las CTPI y dada la importancia que tienen actualmente, se destina un apartado en este mismo documento para la descripción de las mismas.

1.6. Vías y factores que regulan la autorrenovación y pluripotencialidad de las células troncales

Como se mencionó anteriormente, las CT pluripotenciales tienen dos características principales: la capacidad de autorrenovarse indefinidamente y la capacidad de generar cualquier linaje celular de un organismo adulto. Las CT pluripotenciales se obtienen durante el desarrollo embrionario como las CTE, que son las células pluripotenciales por excelencia, o a través de la reprogramación de las células somáticas como las CTPI.

Una CT pluripotencial tiene la capacidad de conservar y modular sus propiedades de autorrenovación y diferenciación con la finalidad de cumplir las demandas fisiológicas y, de esta manera, mantener la homeostasis del cuerpo; lo que implica, que debe contar con mecanismos que regulen su quiescencia, supervivencia, estado de diferenciación y de proliferación.

El conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan la autorrenovación y la pluripotencialidad es de suma importancia ya que, con ello no sólo se puede comprender y conocer más del desarrollo embrionario y la especialización celular; sino también, permite desarrollar mejores técnicas de reprogramación que impacten directamente en la generación de las CTPI; en la evaluación del estado de diferenciación de cualquier célula troncal y en el empleo de las mismas en la investigación y la clínica.

La pluripotencialidad y la autorrenovación son dos propiedades relacionadas entre sí, pues la autorrenovación requiere mecanismos que le confieran la habilidad de dividirse sin diferenciarse, es decir, la clave de autorrenovación es el mantenimiento de la pluripotencialidad [39].

La pluripotencialidad está altamente regulada por factores extrínsecos e intrínsecos. Los factores extrínsecos comprenden todas las señales extracelulares que pueden propagarse a través de las vías de transducción de señales intracelulares que convergen en la red genética que controla la pluripotencialidad. Dentro de las vías de señalización dilucidadas que regulan la pluripotencialidad inhibiendo la diferenciación, la supervivencia y proliferación de las células pluripotenciales se enlistan en la Tabla 3 [95].

Tabla 3. Factores extrínsecos que regulan la pluripotencialidad [95]

Vía de señalización intracelular	Moléculas de señalización extracelular
TGF- β	TGF- β - Activina - Nodal GDF incluyendo la miostatina BMP
RTKs	FGF-2 IGF PDGF S1P NRG1
PI3K	IGF
WNT	Proteínas WNT
JAK-STAT	LIF

TGF- β = Factor de crecimiento transformante β .

RTK = Receptor de tirosina cinasa.

GDF = Factor de crecimiento y diferenciación.

BMP = Proteína morfogénica del hueso.

FGF-2 = Factor de crecimiento de fibroblastos 2

IGF = Factor de crecimiento similar a la insulina.

PDGF = Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

S1P = Esfingosina 1-fosfato.

NRG1 = Neurregulina 1.

PI3K = Fosfoinositol 3-cinasa.

WNT o Wnt = Winless.

JAK-STAT = Cinasa de Janus/ Transductor de señal y activador de la transcripción.

LIF = Factor inhibidor de la leucemia.

Las señales intrínsecas que realizan el mantenimiento de la pluripotencialidad están integradas por los factores de transcripción OCT4 (también denominado POU5F1), NANOG y SOX2, los cuales conforman el denominado circuito regulatorio de la pluripotencialidad. Estos factores actúan en conjunto como activadores o represores transcripcionales de un gran número de genes para inducir la expresión de los genes relacionados con el mantenimiento de la pluripotencialidad o para reprimir la expresión de aquellos que conducen a la diferenciación (Tabla 4) [7].

Dentro de los factores intrínsecos también se encuentran los reguladores epigenéticos como las proteínas del grupo *Polycomb* y *Trithorax*, las cuales modulan la expresión de numerosos genes implicados en el desarrollo embrionario mediante la modificación de histonas [97].

Tabla 4. Factores de transcripción que regulan la pluripotencialidad. Modificada de [96]

Factor	Descripción	Función
OCT-4 (POU5F1)	Factor de transcripción 1 clase 5 que contiene un dominio POU.	Crucial para el mantenimiento de la pluripotencialidad; se homodimeriza o heterodimeriza con otros co-factores como SOX2 para regular el estado de las CTE; su ausencia en las CTE resulta en la pérdida de la pluripotencialidad y letal para el embrión en etapa de blastocisto.
SOX2	Proteína de unión a perteneciente a la familia con cajas <i>HMG</i> relacionada con <i>SRY</i>	Regula el estado pluripotencial; su delección en CTE resulta en la pérdida de la pluripotencialidad; en ratones es letal para el embrión ya que falla el mantenimiento del epiblasto.
NANOG	Proteína de homeodominio NANOG	Es un importante regulador de la pluripotencialidad de las CTE y del desarrollo de las células germinales; la delección de <i>Nanog</i> en ratones resulta letal para el embrión; las CTE carentes de <i>NANOG</i> pierden la pluripotencialidad.
KLF4	Miembro 4 de la familia de los factores de transcripción tipo Kruppel	Es un supresor tumoral y a la vez oncogén que regula la diferenciación, crecimiento y ciclo celular; su ausencia en ratones conlleva a la muerte postnatal por deficiencias en la piel.
c-MYC	Factor de transcripción perteneciente a la familia de proteínas con múltiples dominios hélice-asa-hélice	Implicado en la proliferación celular, la replicación del DNA, la apoptosis, la inhibición de la diferenciación celular y la metástasis; la ausencia de <i>c-Myc</i> en ratones es letal para el embrión por defectos en el desarrollo del tejido cardíaco y neuronal; CTE carentes de <i>c-MYC</i> disminuyen el progreso tumoral.
LIN28	Proteína de unión a RNA	Regula la traducción y estabilidad del mRNA durante la diferenciación; se localiza en los cuerpos-P (sitios de regulación de mRNA y miRNA)

1.6.1 Determinación de la pluripotencialidad de las células troncales

Existe una numerosa cantidad de CT las cuales comparten la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares. Sin embargo, sólo las células pluripotenciales como las CTE, tienen el potencial de desarrollarse en todos los linajes celulares de un organismo adulto y pueden crecer ilimitadamente. Los avances tecnológicos para la identificación y aislamiento celular así como el desarrollo de las nuevas técnicas de reprogramación celular han permitido el hallazgo y generación de más células pluripotenciales como las CTE-tipo, por lo que ha sido de gran importancia determinar el verdadero estado de pluripotencialidad de las células. De forma general, para que una célula troncal pueda considerarse pluripotencial debe ser caracterizada a nivel celular, molecular y funcional; además debe ser evaluada su participación en la ontogénesis [44].

La caracterización celular y molecular indica si las células comparten características morfológicas similares a las CTE y si presentan marcadores que confirmen su estado de “indiferenciación” respectivamente [44]. Como características morfológicas, las células pluripotenciales poseen una relación núcleo-citoplasma alta, nucleolos prominentes y una arquitectura nuclear y de cromatina distintiva (laminar, manchas nucleares y dominios de heterocromatina) [49]. Las células pluripotenciales también crecen rápidamente debido a que la fase G1 de su ciclo celular es muy corta [50,51,52].

Los marcadores de superficie más comúnmente empleados para determinar la pluripotencialidad son los antígenos embrionarios de estado específico SSEA-1, SSEA-3 y SSEA-4 (SSEA, por sus siglas en inglés, *stage-specific embryonic antigen*); y los antígenos de rechazo tumoral TRA-1-60 y TRA-1-80 (TRA, por sus siglas en inglés, *tumor rejection antigen*). Otros marcadores de pluripotencialidad son: la actividad de la telomerasa y de la fosfatasa alcalina y los factores de transcripción OCT-4, SOX-2, NANOG y KLF4. La expresión de estos marcadores usualmente es detectada por técnicas de inmunocitoquímica y amplificación selectiva del material genético (DNA o mRNA) [44].

Recientemente se han descubierto características conservadas en las CTE tanto de ratón como de humano, como son los patrones de modificación de histonas [45,46] y los perfiles de expresión de miRNA, que también podrían funcionar como marcadores de pluripotencialidad [47,48].

La caracterización funcional permite observar la capacidad de las células para formar los tipos celulares representativos de las tres capas embrionarias. Se evalúa mediante ensayos *in vitro* e *in vivo* [44]. Los ensayos *in vitro* comprenden la formación de cuerpos embrionarios (o embrioides) [53] y la diferenciación dirigida [54], mientras que el ensayo *in vivo* se realiza induciendo la formación de teratomas.

La producción de quimeras permite evaluar la contribución de las células para formar los linajes celulares competentes que conforman un organismo adulto, incluyendo la línea germinal; es un ensayo *in vivo* y se considera el estándar de oro para determinar la pluripotencialidad seguida de la formación de teratomas. Existe otro ensayo que también permite verificar la participación de las CT en la ontogénesis que es la complementación tetraploide [44].

1.7. Células troncales pluripotenciales inducidas

La reprogramación celular es un conjunto de técnicas que tienen por objeto modificar el perfil de expresión génica en un determinado tipo celular, de tal forma que los genes que habían dejado de expresarse en una etapa determinada del desarrollo o bien, que nunca se expresaron, comiencen a hacerlo para obtener células con un fenotipo totalmente distinto. El éxito de la reprogramación celular depende en gran manera de la plasticidad celular y puede ocurrir mediante dos procesos: desdiferenciación y transdiferenciación [93].

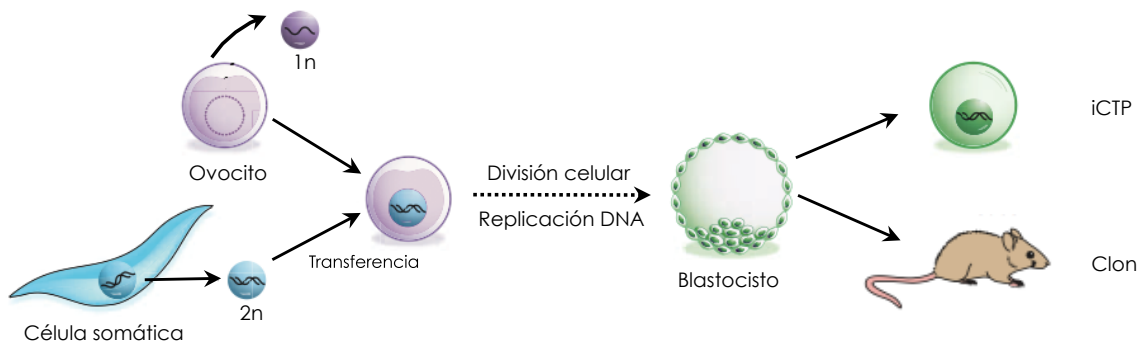
La desdiferenciación celular supone la recuperación de la capacidad de proliferación y diferenciación, en el grado que sea; es decir una célula diferenciada terminalmente regresa a un estado menor de diferenciación a partir del cual posteriormente puede inducirse su especialización. Mientras que la transdiferenciación implica la conversión directa de un tipo

celular completamente diferenciado a otro sin pasar por un grado de diferenciación menor [93].

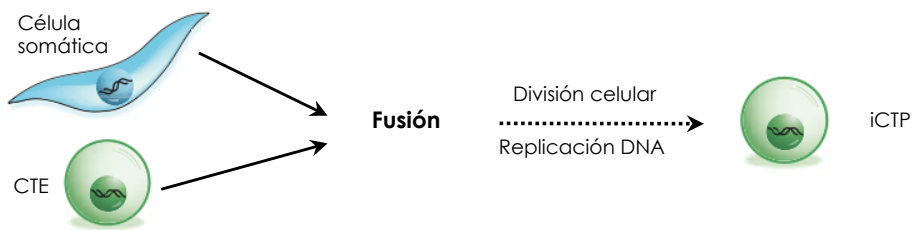
Las células representativas del proceso de desdiferenciación son las CTPi las cuales se definen como células somáticas provenientes de tejidos adultos que han sido sometidas a un proceso de reprogramación nuclear mediante la expresión forzada de genes y factores de transcripción, y que adquieren características moleculares y funcionales que les hacen semejantes a una CTE, es decir, comparten la morfología, estado epigenético, grado de proliferación y diferenciación [27,64].

Existen diversos métodos para inducir la reprogramación celular y obtener las CTPi, como son: la transferencia nuclear de células somáticas, la exposición de células somáticas a extractos celulares, la fusión celular y la utilización de factores de transcripción específicos (reprogramación directa) [65] (Fig 6).

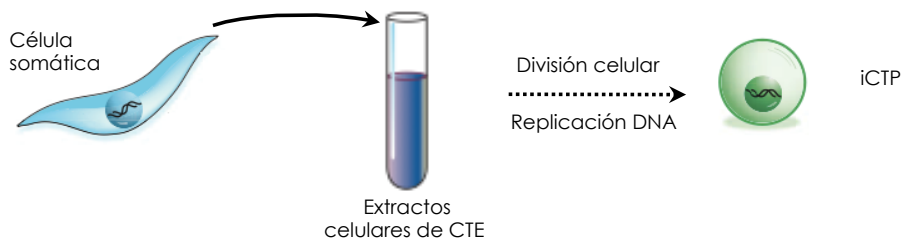
a) **Transferencia nuclear de células somáticas**



b) **Fusión celular**



c) **Extractos celulares**



d) **Reprogramación directa**

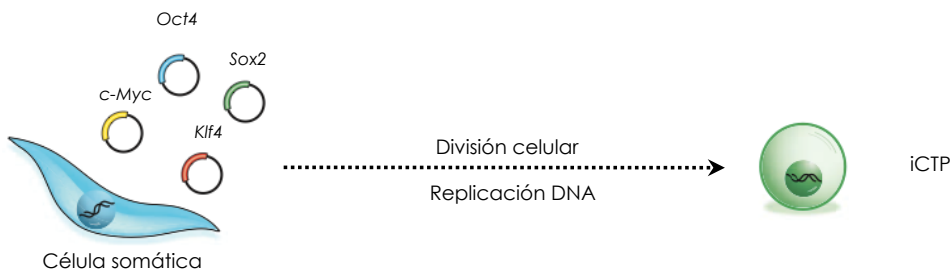


Figura 6. Métodos para la reprogramación nuclear de las células somáticas. Una célula somática puede ser reprogramada hacia un estado pluripotencial alterando su patrón de expresión génica. a) *Transferencia nuclear de células somáticas*. El núcleo de una célula somática es transplantado a un ovocito enucleado. En el ambiente del ovocito, el núcleo de las células somáticas es reprogramado hacia un estado pluripotencial. b) *Fusión celular*. Dos células distintas se unen para formar una sola entidad. La célula más diferenciada es reprogramada por dominancia de la célula menos diferenciada. c) *Extractos celulares*. La exposición de una célula somática ante extractos citoplasmáticos y nucleares de células indiferenciadas inducen su reprogramación. d) *Reprogramación directa*. La pluripotencialidad se adquiere por inducción de la expresión de los factores de transcripción: *Oct-4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*. Los factores de transcripción son introducidos a las células somáticas mediante vectores integrativos o no integrativos. Modificada de [70]

La transferencia nuclear de células somáticas (TNCS), también conocida como clonación, constituye el primer intento para reprogramar una célula somática a un estado de diferenciación más primitivo. Los primeros experimentos se realizaron en anfibios [66] y más tarde en mamíferos siendo Dolly el primer mamífero exitosamente clonado [67]. Estos experimentos demostraron que el estado de diferenciación de una célula es reversible y que las restricciones impuestas en el genoma durante el proceso de especialización celular se deben a cambios epigenéticos y no a cambios en el genoma [70].

La TNCS se realiza mediante el trasplante del núcleo de una célula somática a un ovocito enucleado el cual proporciona todos los factores de reprogramación que activarán los genes que regulan la pluripotencialidad [65]. Esta célula reconstruida es estimulada para iniciar su desarrollo mediante un aumento transitorio de la concentración del calcio intracelular libre inducido por pulsos eléctricos u otros agentes químicos [68]. Si la célula se mantiene en medios de cultivos secuenciales que favorezcan su desarrollo hasta las etapas más tempranas del embrión y posteriormente se implanta en un útero, éste tiene el potencial de desarrollarse hasta formar un organismo completo e idéntico al del cual se aisló; es decir, se trata de un clon. Si en vez de implantarse, se mantiene en un medio de cultivo que favorezca su proliferación más no su diferenciación puede dar lugar a una población de células pluripotenciales genéticamente iguales [65] (Fig. 6a).

Cuando una célula somática es expuesta a extractos citoplasmáticos y nucleares de células indiferenciadas, éstos pueden inducir la reprogramación de la expresión génica y promover su pluripotencialidad ya que contienen los factores de transcripción que la regulan [65]. En este proceso los extractos celulares se obtienen a partir de las CTE, CTCE, CTGE u otras CTE-tipo mediante la sonificación de las células y su recolección por sedimentación. A este extracto se insertan las células somáticas previamente permeabilizadas con toxinas bacterianas u otras sustancias. Tras el periodo de incubación, la membrana citoplasmática es sellada nuevamente con cloruro de calcio y finalmente las células desdiferenciadas se mantienen en cultivo [65, 69] (Fig. 6c).

La reprogramación nuclear mediante fusión celular implica la unión de una célula somática con una célula troncal pluripotencial (e.g. CTE, CTCE y CTGE) para formar una sola entidad. En este proceso se observa que bajo ciertas condiciones el fenotipo de la célula menos diferenciada es dominante sobre la célula con el fenotipo más diferenciado, esto se debe a que la célula pluripotencial contiene en su citoplasma y núcleo factores de reprogramación que pueden modificar el estado epigenético de la célula somática [65] (Fig. 6b).

La pluripotencialidad también puede ser recuperada si se induce la expresión de factores de transcripción asociados al mantenimiento de la misma mediante la inserción de los genes que los codifican a las células somáticas. Los principales factores de transcripción empleados son OCT-4, SOX-2, c-MYC, KLF4 y NANOG cuyos genes, que por sí solos o en combinación, son introducidos a las células somáticas a través de vectores virales o no virales [7,65,70] (Fig. 6d). Las primeras CTPi realizadas por este método se registró en el 2006 cuando fibroblastos de ratón fueron reprogramados a un estado pluripotencial induciendo la expresión de los cuatro factores, *Oct-4*, *Sox-2*, *c-Myc* y *Klf4* [19]. Un año después, se obtuvieron CTPi a partir de fibroblastos humanos bajo el mismo conjunto de factores de transcripción o también mediante *OCT-4*, *SOX-2*, *NANOG* y *LIN28* [18, 20]. Ver Tabla 4 para descripción de los factores de transcripción.

La técnica más común es la transducción génica utilizando retrovirus [19] o lentivirus [72], sin embargo, su gran capacidad de integración al genoma tiene como consecuencia el modificar de manera permanente el material genético de las CTPi ya que pueden inducir mutaciones en los sitios de inserción, reactivar transgenes y silenciar genes, entre otros efectos; y por ende la célula no pueda ser empleada para los fines creados o bien, se obtienen resultados no deseados. Por ejemplo, en un ensayo se observó que el 20% de los ratones generados a partir de las CTPi reprogramadas mediante transducción retroviral con *Oct-4*, *Sox-2*, *Klf4* y *c-Myc* formaron teratomas debido a que la expresión de *c-Myc*, fue reactivada [72]. *c-Myc* es un potente oncogen implicado en la proliferación celular, replicación del DNA, inhibición de la diferenciación celular y la metástasis, no es indispensable para la reprogramación nuclear, sin embargo, afecta considerablemente su eficiencia [71].

Ante la problemática que representa emplear técnicas que comprometen la integridad del material genético y la eficiencia del proceso de producción de las CTPi, se han desarrollado tecnologías alternativas que eviten el uso de vectores que integren su material genético en el genoma del hospedero como: la utilización de adenovirus [73] y virus Sendai no integrativos [75], la transfección transitoria con plásmidos [76], el uso de vectores episomales no integrativos [74] y transposones PiggyBac [77,78], el empleo de miRNA [81,82,83] y minicírculos de DNA [79,80], la exposición directa a las proteínas recombinantes de los factores de transcripción [84, 85, 86] y compuestos químicos como las moléculas pequeñas [87, 88, 89] así como la nano infección [90, 91, 92]. Sin embargo, la mayoría de estos métodos aún implican la exposición de las células a material genético exógeno y aunque, por lo menos en teoría minimizan el riesgo de modificación del genoma de la célula blanco, este riesgo no puede ser descartado de manera absoluta.

La generación de CTPi es un avance muy significativo y revolucionario ya que prometen excelentes oportunidades y resultados en la terapia celular, medicina regenerativa, modelado de enfermedades y en la investigación y desarrollo de medicamentos. Además, las CTPi humanas proporcionan una alternativa al uso de embriones y con ello la superación de los problemas éticos, sociales y religiosos. Asimismo, las nuevas técnicas de reprogramación nuclear permiten la generación de líneas celulares pluripotenciales paciente-específicas, superando así el potencial rechazo inmunológico [93] (Fig. 7).

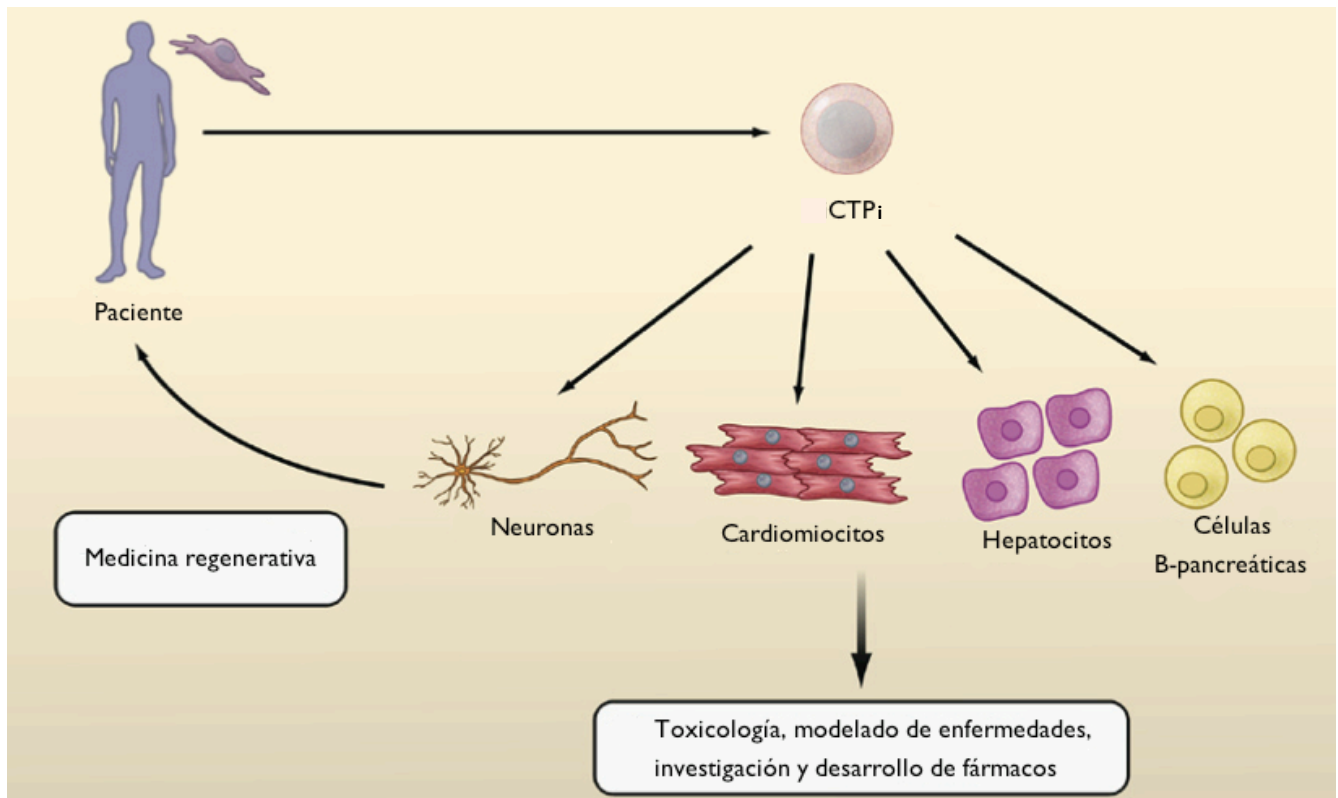


Figura 7. Aplicaciones de las CTPi. Las CTPi pueden obtenerse a partir de una variedad de células somáticas. La generación de las CTPi paciente-específica representa una oportunidad única para el tratamiento de múltiples enfermedades, de una manera eficiente y segura. También representan una herramienta única para el estudio de las bases moleculares y celulares de las enfermedades y el desarrollo de modelos *in-vitro* para estudios farmacológicos. Modificada de [94]

Capítulo 2. Investigación y desarrollo de nuevos fármacos y medicamentos.

La industria farmacéutica es un elemento importante dentro de los sistemas de salud de todo el mundo. Está constituida por numerosas organizaciones públicas y privadas cuyo principal objetivo es mejorar la salud de los seres vivos a través de la investigación, innovación, desarrollo, fabricación y comercialización de medicamentos e insumos eficaces, seguros, accesibles y acordes con los padecimientos que aquejan a la población. Los medicamentos es una de las tecnologías clínicas más usadas para la prevención, tratamiento y rehabilitación de la salud, lo que convierte a la industria farmacéutica en la principal fuente de innovación en esta materia [125].

La innovación y éxito de la industria farmacéutica depende altamente de la implementación de programas estratégicos de I+D que tengan como principal objetivo generar y extender el conocimiento científico y aplicarlo al descubrimiento de nuevos medicamentos. El proceso de I+D de un nuevo medicamento ocurre a través de 3 largos periodos: pre-desarrollo, desarrollo preclínico y desarrollo clínico [125] (Fig. 8).

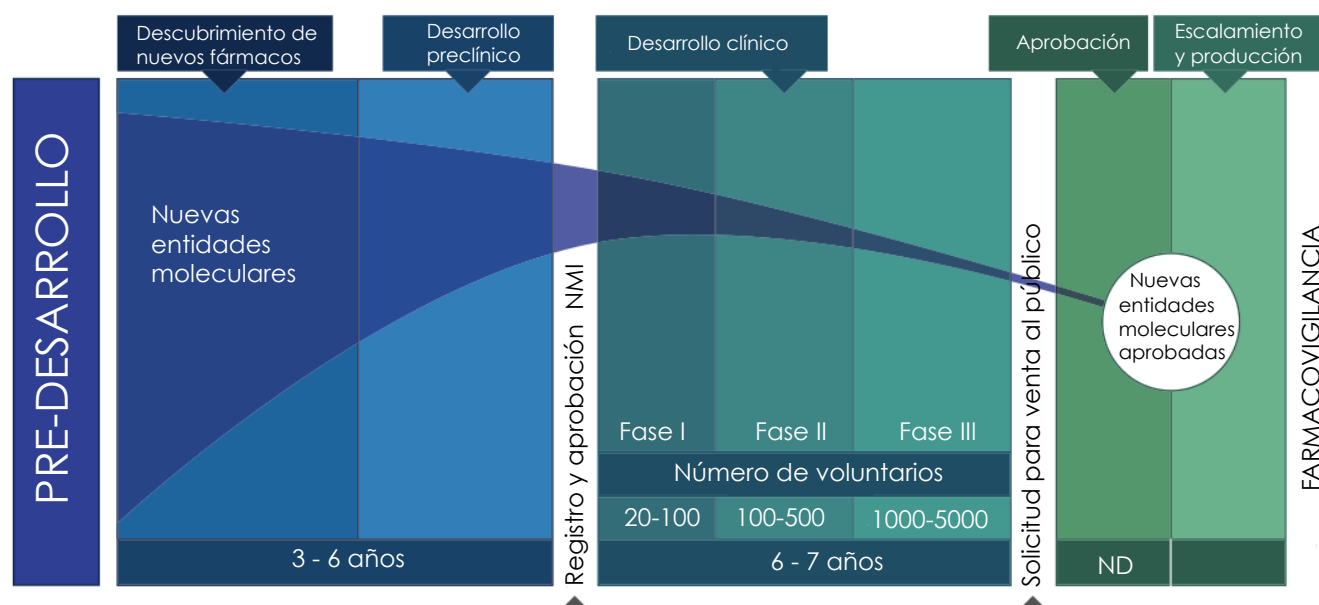


Figura 8. Investigación y desarrollo (I+D) de un nuevo medicamento. Antes de que un medicamento salga a la venta pasa por un proceso largo, complejo, costoso y altamente regulado que está conformado por 3 etapas: predesarrollo, desarrollo preclínico y desarrollo clínico. NMI = Nuevo medicamento en investigación, ND = No determinado. Modificada de [128]

2.1 Proceso de investigación y desarrollo de un nuevo medicamento

2.1.1 Pre-desarrollo

En la **etapa de pre-desarrollo**, mediante la investigación básica se intenta buscar e identificar nuevas dianas terapéuticas [124], para ello es necesario, la comprensión de los mecanismos físicos y moleculares de la enfermedad, es decir su fisiopatología, de esta manera será posible encontrar aquella molécula, gen o proteína que actuará como blanco y a partir de la cual se podrán sintetizar e identificar aquellos compuestos con actividad biológica y selectividad que los hará candidatos a nuevos fármacos y posteriormente a medicamentos. El blanco debe ser una unidad molecular única de importancia clave en la fisiopatología y debe estar validado para demostrar que realmente está implicado en la enfermedad y que puede interactuar y desencadenar una respuesta ante un fármaco. Una vez que el blanco ha sido identificado, comienza la búsqueda de la nueva entidad molecular (NEM) que tendrá un efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio probando miles de compuestos en diversos niveles de organización biológica (molecular, celular, tejidos, órganos, sistemas y animales íntegros). Al proceso masivo y general de cribado o tamizaje de moléculas se denomina *screening* en inglés. Durante esta etapa se prueban alrededor de 8,000 a 10,000 sustancias las cuales surgen por una variedad de estrategias como: síntesis *de novo*, síntesis de análogos de fármacos con una actividad farmacológica conocida, aislamiento de fuentes naturales y al azar [124,126].

2.1.2 Desarrollo preclínico

Una vez que se han identificado y seleccionado las NEM, y previamente a que sea administradas en humanos, se inicia la etapa preclínica donde se realiza la caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las NEM, y se llevan a cabo las pruebas experimentales que determinarán los perfiles farmacéuticos, farmacodinámicos, farmacocinéticos y toxicológicos empleando modelos *in vitro* e *in vivo*. El principal objetivo durante los primeros estadios de la etapa preclínica, es conocer cuántas moléculas líderes pueden llegar a absorberse y distribuirse, y cuántas de ellas, se metabolizan y son eliminadas de los organismos vivos sin producir un efecto tóxico. En algunos casos, y si procede,

posteriormente se inicia un proceso de optimización de algunas de las NEM, alterando ligeramente su estructura química, con el objetivo de modificar y mejorar algunas de las propiedades anteriormente evaluadas [124].

Los estudios farmacéuticos tienen como objetivo determinar la presentación del fármaco, es decir, preparar las formas farmacéuticas que garanticen la estabilidad y disponibilidad del fármaco en los sitios de acción. Estos estudios permite obtener información de las propiedades fisicoquímicas del compuesto a prueba, esencialmente para determinar su solubilidad y estabilidad en el vehículo por el cual se administrará [124].

Los estudios farmacocinéticos tienen como finalidad obtener los datos cualitativos y cuantitativos de la absorción, distribución, metabolismo y eliminación de un fármaco en un organismo. A partir de ellos se determina si la NEM se absorbe por las vías de administración elegidas y se conoce el rango de dosificación y la frecuencia de administración para obtener el resultado deseado. La información farmacocinética es útil para predecir el inicio y la duración del efecto al establecer la velocidad y magnitud de la absorción del fármaco y de sus metabolitos en los diferentes órganos, los procesos de transformación del fármaco, la velocidad y vías de eliminación [124].

Durante los estudios farmacodinámicos se pretende demostrar el efecto terapéutico del fármaco y su mecanismo de acción. Asimismo, trata de establecer la relación entre las dosis y concentraciones administradas del nuevo fármaco, con la intensidad y duración de los efectos producidos. No sólo evalúa el efecto terapéutico previsto, sino también los posibles efectos nocivos o indeseables sobre los principales órganos y sistemas (sistema nervioso, aparato respiratorio, cardiovascular, gastrointestinal o renal). Los estudios farmacodinámicos también deben considerar las posibles interacciones con otros medicamentos [124].

Dentro el desarrollo preclínico, los estudios toxicológicos, son los más importantes ya que tienen como objetivo establecer los efecto tóxicos de la NEM en diferentes especies de animales y cultivos celulares, predecir los riesgos que pueden estar asociados a su administración en humanos sanos y decidir si la NEM es lo suficientemente segura para su uso en la investigación clínica. Los estudios toxicológicos involucran la administración del

fármaco a corto y mediano plazo, y son diseñados para determinar el riesgo de toxicidad aguda, subaguda, subcrónica y crónica, así como el riesgo de teratogénesis, mutagénesis y carcinogénesis [124].

La etapa del desarrollo preclínico tiene una duración aproximada de 2 a 3 años. Los resultados que se obtengan en esta fase son indispensables ya que son los que determinan si se podrá continuar con el desarrollo de la NEM o medicamento en investigación. Toda la información generada en esta etapa sirve como base para la obtención de la autorización del inicio del desarrollo clínico por las autoridades regulatorias [126].

2.1.3 Desarrollo clínico

La etapa de **desarrollo clínico** de nuevos medicamentos es el periodo donde se realizan los primeros estudios clínicos en humanos y tiene como propósito evaluar la terapéutica. Es el método más definitivo para determinar si el empleo del nuevo medicamento tiene el efecto postulado y determinar la incidencia de los efectos adversos o complicaciones durante su uso [126]. Esta etapa tiene una duración aproximada de 6 a 7 años, está altamente regulada y debe cumplir con las Buenas Prácticas Clínicas (BPC). El desarrollo clínico se clasifica en fase I, II y III y se describen a continuación:

- ▶ **Fase I.** Busca determinar el perfil de seguridad, la pauta de administración más adecuada, la tolerancia, parámetros farmacocinéticos y el mecanismo de acción. El tamaño de la muestra varía entre los 20-100 voluntarios sanos. La duración de esta fase es de aproximadamente 1.5 años [124,126].

- ▶ **Fase II.** Evalúa la eficacia terapéutica del medicamento para una indicación concreta en pacientes que presentan la enfermedad o condición de interés, así como los efectos adversos a corto plazo. La muestra es de 100 a 500 pacientes y tiene una duración de a 1 a 3 años [124,126].

- ▶ **Fase III.** Obtiene datos estadísticamente significativos sobre la seguridad y eficacia. Se identifican las posibles reacciones adversas, interacciones y factores externos que puedan

alterar el efecto farmacológico. También provee las bases de la relación riesgo/beneficio para apoyar el registro del medicamento. La muestra es grande, alrededor de los 1000-5000 pacientes que presentan la enfermedad o condición de interés y tiene una duración aproximada de 3.5 años [124,126].

Una vez finalizada la fase del III del ensayo clínico, el laboratorio que desarrolló el medicamento presenta su solicitud de registro para que sea aprobada su comercialización. Una vez que inicia la comercialización del medicamento, se implementa un sistema de farmacovigilancia, también conocida como fase IV, en la cual se trata de recolectar, vigilar, investigar y evaluar la información sobre los medicamentos con el fin de detectar nuevas reacciones adversas y prevenir daños al paciente [124,127].

2.2 Retos de la industria farmacéutica durante el proceso de investigación y desarrollo de nuevos fármacos y medicamentos

El proceso de I+D de nuevos medicamentos es largo, complejo y costoso. Partiendo desde la selección de la diana terapéutica, el tamizaje de los fármacos, los ensayos preclínicos y clínicos con la molécula activa seleccionada, y hasta la venta del medicamento, el proceso tiene una duración promedio de 10-15 años y una inversión cercana a los \$1,800 millones de dólares [122].

La I+D de medicamentos es un proceso dinámico y lleno de retos constantes que está encabezado por la industria farmacéutica. Actualmente son muchas las condiciones externas que afectan a esta industria y su innovación en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos que los mantengan o coloquen como líderes en la investigación y mercado. Dentro de estos factores se encuentran las grandes pérdidas de ingresos debido a la expiración de patentes, el incremento en los costos de los servicios de salud, las exigencias de las autoridades regulatorias así como, carencias en su infraestructura económica, científica y tecnológica. Sin embargo, el gran reto que enfrenta hoy la industria farmacéutica es el estancamiento y disminución en la productividad de nuevas entidades moleculares o medicamentos [122]. En la figura 9, se presentan el total de las NEM que fueron sometidas para obtener el permiso de venta en los Estados Unidos por el Centro de Investigación y Evaluación de Medicamentos

de la FDA (por sus siglas en inglés, *Food and Drug Administration*). Se observa que un periodo de 10 años (2003-2012) no ha habido un aumento significativo en los sometimientos, es más, se observa que tanto en los años 2003, 2006 y 2010 disminuyeron en un 30% por debajo de la media (33 solicitudes), demostrando así la crisis de productividad del proceso de I+D.

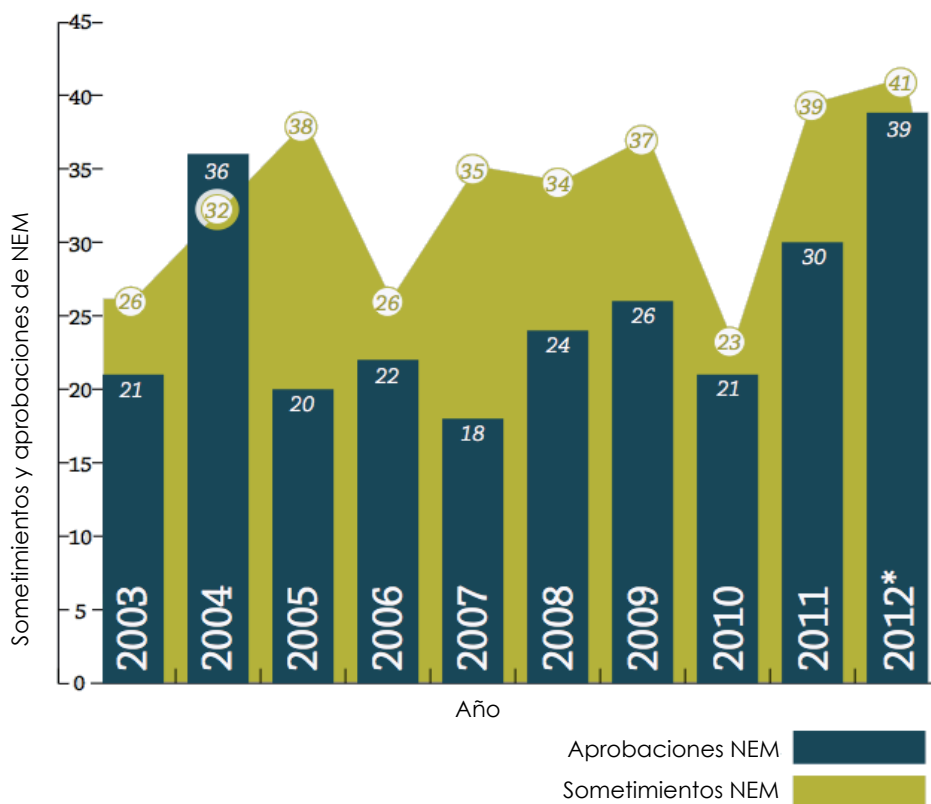


Figura 9. Sometimientos y aprobaciones de las nuevas entidades moleculares (NEM) en el periodo 2003-2012. El gráfico de color verde indica el número de sometimientos para la aprobación las NEM. Las barras azules indican el número de NEM que fueron aprobadas para su venta al público tras un periodo extenso de investigación y desarrollo. Modificada de [129]

Algunos de los factores que disminuyen la productividad son los largos ciclos de I+D, los tiempos de aprobación por las entidades regulatorias, el tamaño de los ensayos clínicos, pero principalmente es la exclusión de las NEM a lo largo del proceso de I+D [130].

La tasa de eliminación de las NEM del proceso de I+D se puede observar a través del estudio realizado a 14 compañías farmacéuticas (Abbott, AstraZeneca, Bayer, Bristol-Myers Squibb, Boehringer-Ingelheim, Eli Lilly, GlaxoSmithKline, Johnson & Johnson, Merck,

Novartis, Pfizer, Roche, Sanofi-Aventis y Schering-Plough) durante el periodo 2005-2009, donde se determinó el rendimiento o porcentaje de éxito de las NEM desde la fase preclínica hasta su aprobación para venta al público (Fig. 10). En este estudio, se muestra que de las 24 NEM que entran a la fase preclínica, sólo una es aprobada. Asimismo se resalta que la transición de la fase II a la fase III de los estudios clínicos es la que posee la mayor tasa (75%) [130].

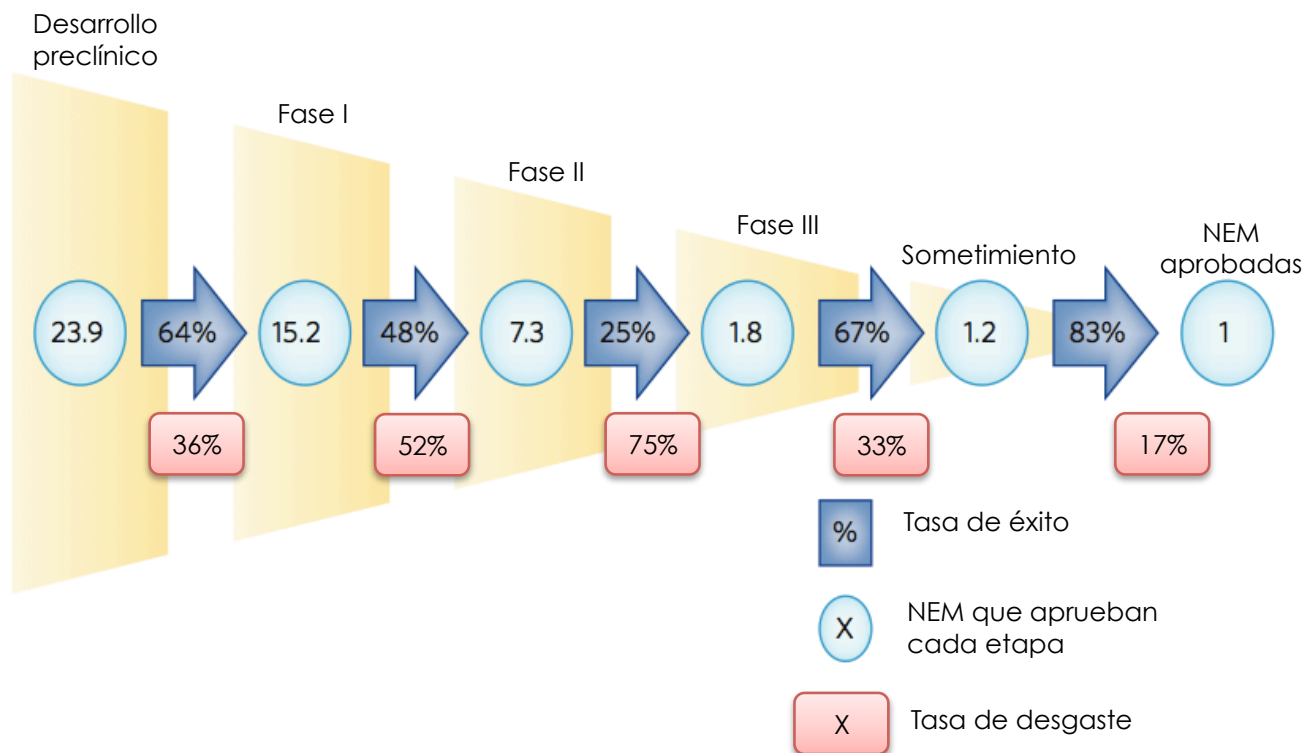


Figura 10. Tasa de éxito de las nuevas entidades moleculares por fase. Estudio realizado a 14 compañías farmacéuticas líderes durante el periodo 2005-2009, donde se determinó el rendimiento o porcentaje de éxito de las NME desde la fase preclínica hasta su aprobación para venta al público. Datos obtenidos de Pharmaceutical Benchmarkin Forum (<http://kmrgroup.com/ForumsPharma.html>). Modificada de [130].

En la fase II se evalúa la efectividad del nuevo medicamento, es decir, en esta fase es donde realmente se obtiene la evidencia de que el medicamento desarrollado modifica o corrige la salud del paciente. Suponiendo que los estudios preclínicos y las primeras fases de los estudios clínicos estuvieron bien diseñados y que se emplearon dosis clínicas con tolerancia

probada cuyo efecto puede ser observado a través de un biomarcador relacionado con el padecimiento o blanco, entonces mayoritariamente se debería observar la efectividad de la actividad terapéutica como reflejo de la interacción del medicamento con la diana terapéutica. Sin embargo, la alta tasa de eliminación que se presenta en esta fase es un indicativo de que el laboratorio que desarrolló la NEM no realizó una selección adecuada de las dianas terapéuticas que participan en el padecimiento. Así que, uno de los factores más importantes para aumentar la productividad del proceso de I+D de la industria farmacéutica y proporcionar medicamentos innovadores a los pacientes, es el mejoramiento de la selección de los blancos terapéuticos y para ello se requieren modelos tanto *in vitro* como *in vivo* que permitan comprender de mejor forma la fisiopatología de la enfermedad [130].

Otras causas importantes involucradas en la deserción tanto temprana como tardía, son las que se refieren a cuestiones de seguridad y toxicidad. Se estima que 70% de las NEM eliminadas durante la fase preclínica son por problemas en su seguridad más que por la eficacia. Esto sugiere que durante el proceso de I+D se deben emplear controles y metodologías que permitan identificar y evaluar los perfiles de seguridad de las moléculas candidatas en las fases tempranas del desarrollo preclínico. Se estima que si se es capaz de predecir en al menos un 10% las fallas previo a la fase clínica se podrían ahorrar alrededor de \$100 millones durante el desarrollo de un nuevo medicamento [131].

Como se observa en la Figura 10, durante la fase I también hay un porcentaje importante en la deserción de NEM. La fase I constituye el primer acercamiento del nuevo medicamento con los humanos, tiene como principal objetivo evaluar su seguridad al determinar el rango de dosis seguras e identificando efectos secundarios y reacciones adversas. Lo anterior indica que los estudios toxicológicos realizados en la fase preclínica no pueden ser escalados en su totalidad a los seres humanos, ya que los modelos de estudio *in vitro* e *in vivo* empleados no son los más aptos [131] dadas sus diferencias biológicas y genéticas, aunado a que en muchas ocasiones no se cuenta con modelos de estudio para todas las enfermedades, sobre todo para aquellas que son poco frecuentes.

Es importante mencionar que aún cuando un nuevo medicamento ha sido aprobado para su venta al público, dado que ha demostrado su eficacia y seguridad, no implica que éste no

pueda ser retirado del mercado tiempo después. Una vez comercializado, el medicamento deja atrás el seguro y resguardado del medio científico de los estudios clínicos para pasar a ser un producto de consumo público legal. Lo más frecuente es que hasta el momento de la comercialización solo se hayan comprobado la eficacia y la seguridad del medicamento en el corto plazo y en un reducido número de personas cuidadosamente seleccionadas. La información obtenida en los estudios clínicos de las distintas fases hasta su aprobación por la autoridad sanitaria no es suficiente para predecir lo que pasará en la práctica clínica habitual, en cuanto a la aparición de reacciones adversas poco frecuentes o de lento desarrollo. Se estima que en los Estados Unidos las reacciones adversas a los medicamentos representan entre la cuarta y la sexta causa de mortalidad [132, 171].

Otra forma de disminuir la deserción de las NEM durante el proceso de I+D, especialmente durante el desarrollo clínico, es realizando una selección más cuidadosa de la población de estudio. La baja productividad de la I+D no siempre depende de la seguridad y eficacia, sino también del diseño de los protocolos clínicos que consideren los factores genéticos de la población. Un ejemplo hipotético de esta situación es cuando un medicamento es excluido durante la fase clínica debido a problemas con la toxicidad cuando lo que realmente ocurrió fue que se emplearon concentraciones de fármaco por fuera de su ventana de seguridad debido a que la población seleccionada no presentaba ningún efecto terapéutico [133].

En general son muchos los factores que impactan a la industria farmacéutica en cuanto a su participación en la innovación de nuevos medicamentos. La disminución de la tasa de eliminación de las moléculas candidatas durante el proceso de investigación y desarrollo es uno de los objetivos primordiales para aumentar la productividad y así mantener su competitividad en el mercado. De tal forma que es necesario lograr un equilibrio entre la eficiencia de los medicamentos y su seguridad durante las etapas más tempranas de este proceso con el fin de reducir la tasa de eliminación, los costos y tiempos asociados al mismo. Esto a su vez implica que la industria farmacéutica deba incursionar en la evaluación e implementación de nuevas tecnologías que afecten positivamente la eficiencia del descubrimiento de nuevos fármacos y medicamentos, siendo una de ellas la tecnología de las CT.

Capítulo 3 . Aplicaciones de las células troncales pluripotenciales en la investigación farmacéutica y desarrollo de nuevos fármacos

La complejidad del proceso de I+D de un nuevo medicamento está diseñada para asegurarse de que todos los medicamentos que se coloquen en el mercado cumplan con las características de seguridad y eficacia. Como se mencionó en el capítulo anterior, este proceso consta de 3 etapas: pre-desarrollo, desarrollo preclínico y desarrollo clínico. El comportamiento de las moléculas candidatas así como, sus efectos en los modelos de estudio es lo que determinará que sean consideradas en las etapas subsecuentes del proceso de I+D. La incapacidad para evaluar y predecir mejor la seguridad y eficacia en etapas tempranas de la I+D lleva a fallas durante el desarrollo clínico, y en ocasiones, después de la comercialización, contribuyendo así a la exclusión de las moléculas candidatas a fármacos y por tanto al estancamiento o declive de la productividad de medicamentos innovadores por parte de la industria farmacéutica.

El proceso de I+D de nuevos medicamentos tiene muchas limitaciones. En primer lugar, la comprensión nula o incompleta de los procesos fisiopatológicos, es decir, aun se desconoce si el problema está a nivel del genoma, transcriptoma, proteoma o metaboloma. Asimismo, no se han dilucidado exactamente las interacciones o condiciones externas que podrían favorecer un determinado padecimiento, tal es el caso de las enfermedades multifactoriales. En segundo lugar, no están disponibles modelos celulares para el estudio de muchas enfermedades, especialmente aquellas que son crónico-degenerativas como la enfermedad de Alzheimer (EA) y la esclerosis lateral amiotrófica, ya que, es difícil la obtención de células con fenotipos patológicos; o de aquellas que ocurren de forma esporádica e involucran aspectos genéticos desconocidos y complejos como el autismo y la Diabetes mellitus tipo 1 (DM1). Como tercer lugar, es la discrepancia de la actividad farmacológica observada en los modelos celulares y animales durante las fases preclínicas, en comparación con los seres humanos durante la fase clínica. En ocasiones en la fase clínica no se observa ninguna actividad terapéutica mientras que en la fase preclínica si, ó viceversa: no se presentan efectos tóxicos durante la fase preclínica cuando si los hay en la fase clínica. Estos resultados son consecuencia de las disparidades biológicas y genéticas entre las dos especies (e.g. humano vs. ratón). Otro reto que presenta el desarrollo de nuevos

medicamentos, es que en muchos casos los pacientes responden de diferente manera al mismo medicamento dada su predisposición genética, aspecto que en la mayoría de los casos no es estudiado durante la fase preclínica, dado que no se tienen líneas celulares humanas con perfiles farmacogenéticos bien caracterizados [134].

En concordancia con lo expuesto en el capítulo 2 y en los párrafos anteriores, se puede determinar que la causa principal de las limitaciones del proceso de I+D de nuevos medicamentos, es que no se cuentan con modelos de estudio tanto *in vitro* como *in vivo* durante las fases tempranas del desarrollo que posean un genotipo y fenotipo adecuado para representar y evaluar el comportamiento de las patologías humanas y su exposición ante distintos compuestos con actividad farmacológica, comprometiendo así, la eficacia y seguridad del medicamento innovador durante la fase clínica y posteriores. La tecnología de las CT supone una gran alternativa ante esta problemática, en especial aquella que se ha centrado en el desarrollo de iCTP

Las CT pluripotenciales tienen la capacidad de generar ilimitadamente células funcionales y fisiológicamente relevantes, como hepatocitos, neuronas y cardiomiocitos, lo que las convierte en una atractiva fuente para las distintas aplicaciones biofarmacéuticas como el descubrimiento de fármacos, modelado de enfermedades, estudios toxicológicos, entre otras [93,135]. A partir de las CTPi se pueden obtener CTPi paciente-específicas y enfermedad-específicas, sin involucrar problemas éticos, sociales y religiosos en cuanto al uso de embriones o los relacionados con el aislamiento de las CTA, lo que facilitaría la creación de paneles de células humanas con una extensa gama de genotipos/fenotipos que favorecerían la identificación de nuevas moléculas candidatas a fármacos y la evaluación de la actividad terapéutica y toxicidad de distintos medicamentos. Por otro lado, el poseer líneas celulares humanas con fenotipos patológicos permitiría profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en un padecimiento lo que promovería la identificación de nuevas dianas terapéuticas (Fig. 11) [135]. También, las CTPi ofrecen la posibilidad de averiguar los factores que contribuyen en la respuesta variable a los fármacos como: género, edad, etapa de desarrollo, historia de exposición ambiental y la variación genética [168].

Para explotar *in vitro* el potencial de las CT pluripotenciales y en especial las CTPI, primero es necesario obtener células indiferenciadas a partir de células somáticas donde se asegure su pureza, estabilidad y calidad, a partir de procedimientos bien estandarizados; así como, conocer los factores y moléculas que participan en la diferenciación hacia un determinado tipo celular. La tecnología de las CT se puede aplicar en cada una de las etapas del proceso de investigación y desarrollo de nuevos medicamentos, desde la comprensión de los mecanismos moleculares de una fisiopatología y la identificación de las dianas terapéuticas hasta la evaluación del perfil de toxicidad.

A continuación se presenta una descripción de las principales aplicaciones y beneficios de las CT pluripotenciales en la investigación farmacéutica y desarrollo de nuevos fármacos y medicamentos.

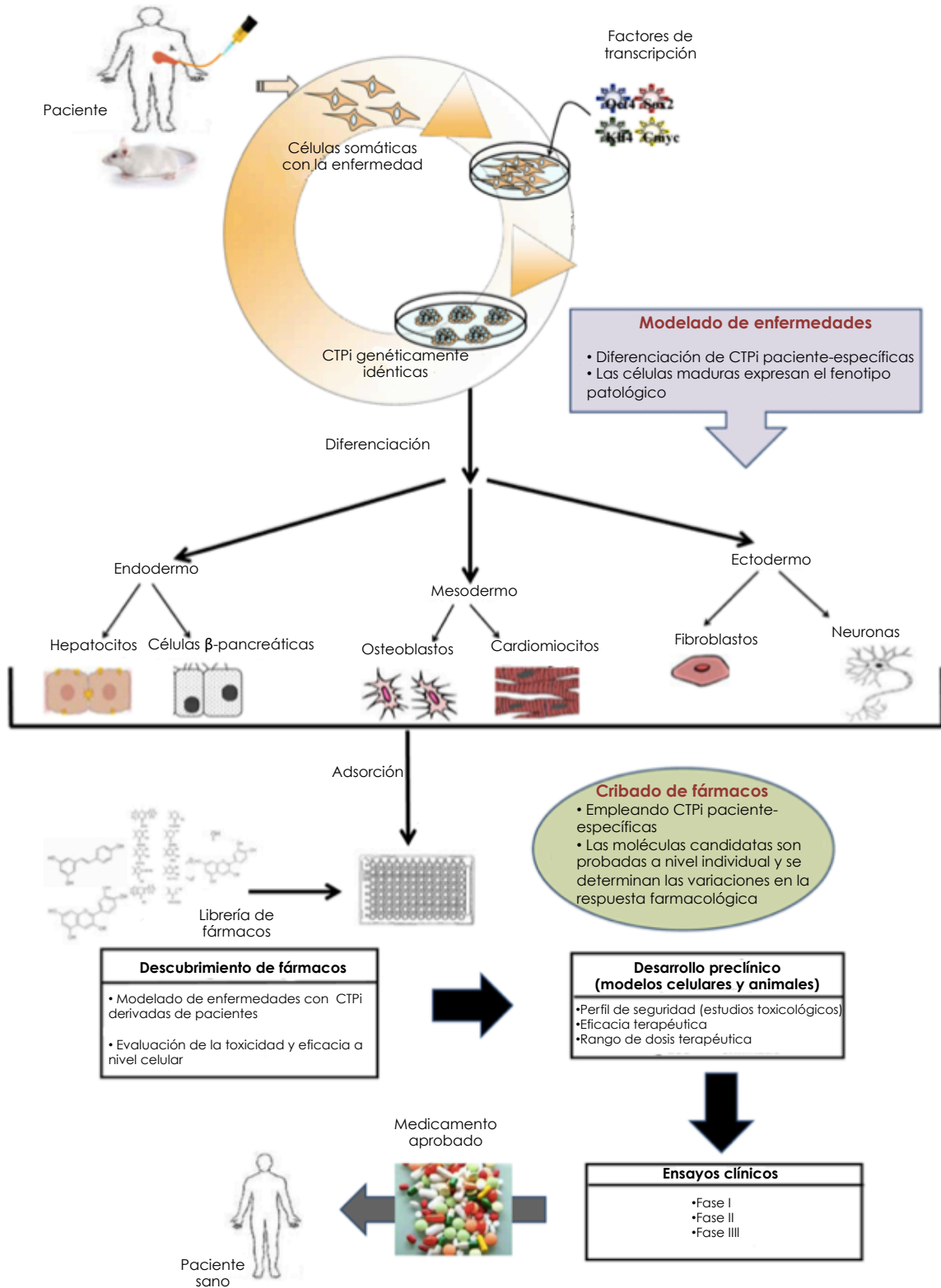


Figura 11. Aplicaciones de las células troncales pluripotenciales inducidas en el descubrimiento de nuevos fármacos y medicamentos. La obtención de las CTPI humanas y su posterior diferenciación en los distintos linajes celulares (por ejemplo, hepatocitos, neuronas, cardiomiocitos o células β-pancreáticas) las convierten en un excelente modelo *in vitro* para el tamizaje de fármacos así como para determinar su perfil de seguridad y eficacia. Modificada de [133]

3.1 Modelado de enfermedades

Teóricamente el modelado *in vitro* de enfermedades puede ser realizado a través de la recolección de células primarias de personas sanas o con alguna patología genética relevante. Sin embargo, esta técnica no es razonable ya que en general se requieren grandes cantidades de células y por tanto de tejido (al cual muchas de las veces es inaccesible) y condiciones especiales de cultivo que mantengan a las células viables, además una alta tasa de proliferación [136]. Ante la dificultad de obtener grandes volúmenes de material para los estudios experimentales y lograr grandes cultivos celulares a partir de las biopsias, la células inmortalizadas representan una gran alternativa como modelos de estudio; sin embargo, estas células con el paso del tiempo frecuentemente presentan anormalidades genéticas y variaciones fenotípicas debido a su cultivo por extensos periodos de tiempo [137].

Los modelos animales proporcionan información útil sobre los mecanismos de la enfermedad. Los ratones son lo que mas frecuentemente se emplean debido a su manipulación física y genética relativamente sencilla [134]; sin embargo, presentan diferencias fundamentales en la genética, fisiología y fisiopatología en comparación con los humanos. Algunos ejemplos de estas diferencias se pueden observar en el sistema cardiovascular, las cuales se enlistan a continuación:

- ▶ La frecuencia cardiaca del ratón es al menos diez veces mayor que la del humano (50 lpm vs. 60 lpm) pero la duración de su electrocardiograma (intervalo QT) es 5-10 veces más corta (450 ms vs 50-100 ms) [138]. El aumento de la frecuencia cardiaca se asocia con un aumento en la fuerza de contracción en los humanos, mientras que en los ratones con una disminución [139].
- ▶ La repolarización de los cardiomiocitos de ratón está mediada principalmente por los canales iónicos de potasio, I_{to} , $I_{K,SLOW1}$, $I_{K,SLOW2}$ e I_{SS} , mientras que en humanos por I_{Ks} e I_{Kr} [138].

▶En humanos la expresión de las cadenas pesadas α y β de la miosina se localiza en las aurículas y ventrículos respectivamente [140], pero en el ratón las cadenas α se expresan en ambos sitios [141].

▶Los cardiomiocitos de ratón no expresan la alfa proteína señal reguladora (SIRPA, del inglés, *signal-regulatory protein alpha*) mientras que los humanos si.

El síndrome de QT largo (SQTL) tipo 1 y 2, es causado por mutaciones que afectan la función de los canales I_{Ks} e I_{Kr} respectivamente. Este padecimiento puede ocasionar palpitaciones, desmayos, convulsiones e inclusive la muerte súbita del paciente. Como se indicó anteriormente, los ratones no poseen estos canales, por lo que sería inútil estudiar la patología y la respuesta farmacológica en este modelo [138].

Otros ejemplo de las diferencias entre especies se puede observar a través del pseudogen *SMN2* (del inglés, *survival motor neurone 2*) el cual participa en la supervivencia de las neuronas motoras en humanos y está implicado en la atrofia muscular espinal (AME), sin embargo este gen está ausente en ratones, moscas y lombrices [142].

Ante tal panorama, distintos grupos e investigadores han comenzado a generar las CTPi a partir de pacientes con distintas enfermedades, ofreciendo una herramienta única para el estudio *in vitro* de los mecanismos de una determinada patología, pero también representan una excelente plataforma para el tamizaje de fármacos. A continuación se presentan algunos ejemplos de las CTPi que actualmente se han derivado de pacientes con enfermedades cardiovasculares, neurológicas, pancreáticas y hepáticas.

3.1.1 Las CTPi como modelo *in vitro* para las enfermedades neurológicas

Existen diversas enfermedades que afectan el sistema nervioso, entre ellas se encuentran las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson (EP); y las enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia. Las CTPi ofrecen una gran oportunidad para estudiar el comportamiento de las neuronas con dichas enfermedades.

Distintos grupos de investigación han generado modelos de enfermedades neurológicas a partir de CTPi de pacientes con defectos genéticos específicos. Dentro de los primeros modelos desarrollados se encuentran los de la AME, la enfermedad de Huntington (EH), el síndrome de Rett y esquizofrenia. Asimismo, se han desarrollado modelos para la EP y la EA [172].

La AME es un trastorno genético autosómico recesivo causado por mutaciones en el gen *SMN1* (por sus siglas en inglés, *survival motor neuron 1*) lo que provoca una disminución en la proteína de supervivencia de las neuronas motoras (SMN) y por tanto una pérdida significativa de las neuronas motoras de la médula espinal. Esta enfermedad se refleja como debilidad muscular y parálisis, lo que puede llevar a la muerte de los pacientes [148]. Ebert y sus colaboradores (2009), generaron CTPi a partir de fibroblastos de la piel de pacientes infantiles con AME, las cuales posteriormente fueron diferenciadas a neuronas motoras mostrando una deficiencia selectiva de la proteína SMN en comparación con el control. Asimismo, se observó que al ser tratadas con ácido valproico y tobramicina hubo un aumento en el nivel de expresión de la proteína SMN [149].

El síndrome de Rett es una enfermedad neurológica progresiva que afecta principalmente a mujeres y forma parte de los trastornos del espectro autista. Es causada por una mutación en el gen *MECP2* (del inglés, *Methyl CpG binding protein 2*) que codifica para la proteína 2 de unión a metil-CpG, lo cual provoca alteraciones en la morfología y comunicación neuronal (disminución del número de sinapsis). Marchetto y sus colaboradores (2010) generaron CTPi a partir de fibroblastos de pacientes con este síndrome; una vez diferenciadas a neuronas, se observó además de las características previamente mencionadas, una alteración en la señalización del calcio y defectos electrofisiológicos. Posteriormente observaron que los defectos en la sinapsis podrían ser rescatados si eran tratadas con gentamicina e IGF1 (por sus siglas en inglés, *Insuline-like Growth Factor 1*) [150] (Fig. 12).

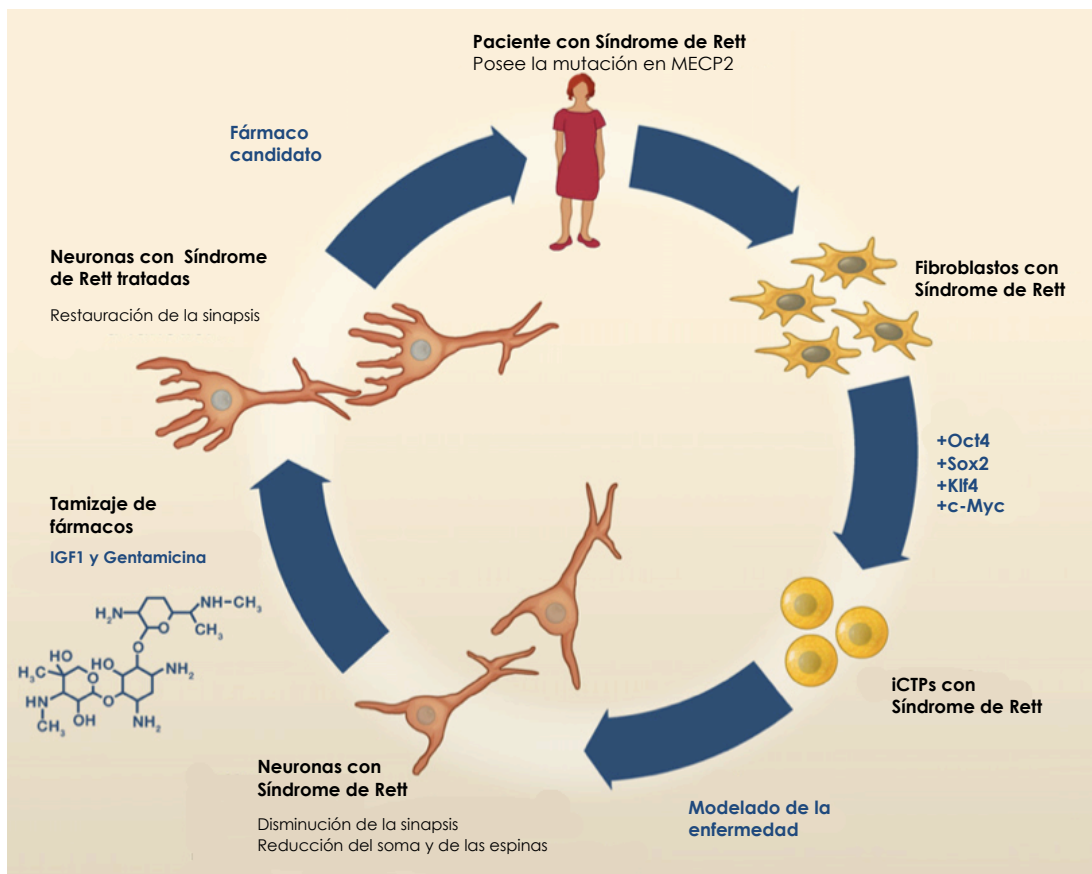


Figura 12. Empleo de las células troncales pluripotenciales inducidas para el modelado *in vitro* del Síndrome de Rett. El síndrome de Rett es un trastorno neurodegenerativo causado por mutaciones en el gen *MECP2*. La obtención de las CTPi a partir de fibroblastos de pacientes que sufren este padecimiento y su posterior diferenciación a neuronas permite recapitular los defectos encontrados así como el tratamiento con fármacos experimentales. Modificada de [150]

La enfermedad de Huntington es un trastorno hereditario autosómico dominante caracterizado por la falta de coordinación, deterioro cognitivo y alteraciones en el comportamiento. Es causada por la degeneración de los núcleos basales del encéfalo debido a un defecto en el gen *HTT* (del inglés, *Huntingtin*) que codifica para la proteína Huntingtina. El defecto consiste en la expansión de repeticiones del trinucleótido CAG, lo que conduce a la generación de tractos de poliglutamina y ganancia de función de la Huntingtina que provoca un efecto tóxico [144]. Park y sus colaboradores (2010) generaron CTPi a partir de fibroblastos de una paciente con 72 repetidos CAG [173]. Zhang y su equipo (2012), además de generar CTPi de pacientes con la EH, han propuesto como alternativa terapéutica la corrección de la patología mediante recombinación homóloga [174].

La EP se caracteriza por la pérdida crónica y progresiva de las neuronas dopaminérgicas nigroestriales ocasionando una desregulación de la función motora. Es una enfermedad multifactorial con etiologías genéticas distintas; algunos de los genes implicados son: *SNCA* (del inglés, *synuclein alpha*), *LRRK2* (del inglés, *Leucine-rich repeat kinase 2*) y *PINK1* (del inglés, *PTEN-induced putative kinase 1*) [145]. Park y sus colaboradores (2010) generaron CTPi a partir de fibroblastos de un paciente con una mutación en el gen *SNCA*. Más recientemente, Nguyen y su equipo (2012) produjeron neuronas dopaminérgicas a partir CTPi de una paciente con una mutación en el gen *LRRK2*, asimismo observaron que estas neuronas presentaban mayor susceptibilidad al estrés oxidativo [175].

En la EA hay una pérdida progresiva de las neuronas y sinápsis por la acumulación de placas seniles que provoca un deterioro mental caracterizado por una lenta y continua pérdida de la memoria. Al igual que la EP, tiene una etiología heterogénea y puede ser generada por mutaciones en el gen *APP* (del inglés, *Amyloid protein precursor*), *PS1* (del inglés, *Presinilin 1*) y *PS-2* (del inglés, *Presinilin 2*). Yagi y colaboradores (2011), generaron dos líneas de CTPi a partir de los fibroblastos de dos pacientes con una mutación en el gen *PS1* (p.A246E) y *PS2* (p.N141I) respectivamente. Posteriormente las diferenciaron a neuronas y demostraron que presentaban un incremento en la secreción del péptido A β ₄₂ [176]. Recientemente Kondo y su grupo (2013) derivaron neuronas y astrocitos de CTPi de pacientes con una mutación en el gen *APP* (p.E693 Δ) y observaron que los agregados del péptido A β no son resistentes a la degradación proteolítica y que al ser tratadas con ácido ácido docosahexaenoico se atenúa el fenotipo patológico [177].

La esquizofrenia es un trastorno psiquiátrico caracterizado por alteraciones a nivel cognitivo, afectivo y de comportamiento que afecta potencialmente la vida del paciente y su entorno. En estudios *post-mortem* se han observado alteraciones en el tamaño del cerebro y en la morfología y funcionalidad de las neuronas; sin embargo los mecanismos moleculares que conllevan a esta enfermedad son complejos y aún se desconocen. Brennand y su equipo (2011), obtuvieron neuronas a partir de CTPi de pacientes con esquizofrenia. En ellas observaron una conectividad y proliferación disminuida, así como una reducción en la expresión de proteínas que participan en la sinapsis como: PSD95 (por sus siglas en inglés, *postsynaptic density protein 95*) y el receptor del glutamato. También identificaron

alteraciones en la expresión de los genes que codifican para algunos componentes de las vías de señalización del AMP-cíclico y WNT. En este ensayo también observaron que las alteraciones previamente descritas eran atenuadas con loxapina, el cual es un medicamento indicado para la esquizofrenia [178].

Los casos anteriores son ejemplos concretos del empleo de las CTPi en el modelado de enfermedades y su repercusión en el tamizaje de fármacos, sin embargo, aún se observa que a pesar de que las CTPi pueden ser diferenciadas completamente a neuronas, o la célula correspondiente, el fenotipo patológico no puede ser recapitulado en su totalidad. Principalmente se presentan problemas como: una maduración neuronal inadecuada, deficiencia sináptica y falla en la conectividad entre neuronas [171]. Asimismo, la aparición de los síntomas en las enfermedades neurodegenerativas dependen de muchos factores entre ellos la edad, así que para obtener células con fenotipos que se asemejen a la realidad, es necesario acelerar la patología a través de mecanismos externos como la exposición a estrés oxidativo y la sobreexpresión de genes relacionados con la enfermedad [147].

3.1.2 Las células troncales pluripotenciales inducidas como modelo *in vitro* para las enfermedades cardiovasculares.

La generación de cardiomiocitos a partir de las CTPi es de particular importancia ya que la obtención directa de células cardíacas de humanos no está disponible o no se cuenta con suficientes donadores y muestra; lo que dificulta su empleo para el estudio de las fisiopatologías de las enfermedades cardiovasculares genéticas, la detección de fármacos candidatos así como la realización de pruebas de eficacia y seguridad. A continuación se mencionan algunos ejemplos de cardiomiocitos derivados de las CTPi paciente-específicos que han permitido identificar y validar algunos blancos terapéuticos, y evaluar la actividad cronotrópica y fisiológica de algunas sustancias.

El síndrome LEOPARD, también conocido como lentiginosis miocardiopática, es una enfermedad genética que se transmite en forma autosómica dominante y es causado por mutaciones en alguno de los siguientes genes: *PTPN11* (del inglés, *Protein-tyrosine phosphatase, nonreceptor-type 11*), *RAF1* (*V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog*

1) y *BRAF* (del inglés, *V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*). Los síntomas característicos de este trastorno incluyen cardiomiopatía hipertrófica, dismorfismos faciales, léntigos, retraso del crecimiento, anomalías genitales y sordera [152]. Carvajal y colaboradores (2010) produjeron cardiomiocitos con el síndrome LEOPARD a partir de dos líneas de las CTPi derivadas de dos pacientes con una mutación en el gen *PTPN11* (p.T468M). A partir de éstos encontraron que posiblemente la cardiopatía hipertrófica está asociada a defectos en las vías de transducción de señales RAS-MAPK (por sus siglas en inglés, *Rat sarcoma-Mitogen activated protein kinase*) [153]. Esto pone de manifiesto la valiosa utilidad de las CTPi paciente-específicas para dilucidar los mecanismos de la enfermedad e identificar las vías de señalización afectadas.

Otro ejemplo representativo de las enfermedades cardiovasculares es el síndrome de QT largo, del cual ya se ha mencionado que no se cuentan con modelos animales que permitan estudiar la patología y la respuesta farmacológica. El SQT1 tipo 1 es consecuencia de una mutación en el gen *KCNQ1* (por sus siglas en inglés, *KQT-like voltage-gated potassium channel-1*) el cual codifica para la subunidad alfa formadora de poros del canal de potasio dependiente de voltaje I_{Ks} . Tras la generación de cardiomiocitos derivados de las CTPi de dos pacientes con una mutación de sentido erróneo (p.R190Q) en el gen *KCNQ1*, se demostró que la prolongación del intervalo QT observado en el electrocardiograma de los pacientes es causado por una disminución en la densidad y alteraciones en la activación y desactivación del I_{Ks} . De igual manera, se observó que la estimulación con adrenérgicos exagera el número de eventos arrítmicos mientras que los β -bloqueadores atenúan el fenotipo. Este ejemplo ilustra el uso potencial de las CTPi paciente-específicas en la investigación de la hipersensibilidad a determinados fármacos [138].

3.1.3 Las células troncales pluripotenciales inducidas como modelo *in vitro* para las enfermedades pancreáticas

La DM1 es una enfermedad autoinmune genéticamente heterogénea en la que intervienen distintos factores ambientales. A pesar de que se cuentan con modelos animales como el ratón NOB (del inglés, *Non-obese diabetic*) y las ratas BB (del inglés, *BioBreeding*) para el estudio de la DM1, generalmente no recapitulan totalmente el fenotipo patológico presente en

los humanos lo que dificulta la extrapolación de los resultados. Recientemente Maehr y sus colaboradores (2009) obtuvieron células β -pancreáticas a partir de las CTPi derivadas de los fibroblastos de dos pacientes con DM1, lo cual representa un avance significativo para la comprensión de las causas de la enfermedad y para el desarrollo de estrategias profilácticas y terapéuticas eficaces [154].

3.1.4 Las células troncales pluripotenciales inducidas como modelo *in vitro* para las enfermedades hepáticas

Recientemente se han reportado diferentes estudios donde se han generado hepatocitos funcionales a partir de las CTPi de pacientes con enfermedades hepáticas congénitas. Rashid y sus colaboradores generaron CTPi a partir de los fibroblastos de la piel de pacientes diagnosticados con deficiencia de α 1-antripsina, hipercolesterolemia familiar y con la enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo 1a [155]. La deficiencia de α 1-antripsina es un trastorno autosómico recesivo causado por una mutación del gen *SERPINA1* (por sus siglas en inglés *Serpin Peptidase Inhibitor, Clade A, Member 1*) que provoca una alteración en la secreción de la proteína α 1-antripsina, la cual se acumula generando un efecto tóxicos sobre el hígado y pulmones [156]. La hipercolesterolemia familiar es una enfermedad hereditaria autosómica dominante caracterizada por la elevación del colesterol en el suero unido a lipoproteínas de baja densidad debido a una mutación en el gen *LDLR* (por sus siglas en inglés, *Low Density Lipoprotein Receptor*); los hepatocitos son las células que mayoritariamente expresan este receptor, de ahí la importancia de entender la desregulación de la endocitosis de colesterol debido a los severos problemas cardiovasculares que este trastorno genera [157]. La enfermedad de almacenamiento de glucógeno tipo 1a, también conocida como enfermedad de von Gierke, es causada por una mutación en el gen *G6PC* (del inglés, *Glucose-6-phosphatase, catalytic subunit*) el cual codifica para la subunidad catalítica de la enzima glucosa-6-fosfatasa; los individuos afectados presentan hipoglicemias severas y hepatomegalia provocada por la acumulación de glucógeno [158]. Los hepatocitos derivados recapitularon las características patológicas principales de las enfermedades, lo que demuestra viabilidad del modelado de las enfermedades hepáticas a través de las CT [155].

Otro ejemplo del modelado de enfermedades hepáticas es la generación de las CTPi de pacientes con la enfermedad de Wilson, los cuales presentan una alteración en el metabolismo del cobre; lo que ocasiona su acumulación en diferentes tejidos, principalmente hígado, núcleos basales y córnea, originando múltiples manifestaciones clínicas hepáticas y neurológicas [159]. Zhang y sus colaboradores (2011) fueron capaces de generar estas células, e identificaron que la ATPasa transportadora de cobre tipo P (ATP7B) tenía una localización citoplasmática anormal así como defectos en su funcionalidad. Por otro lado, observaron que la enfermedad podría ser revertida mediante terapia génica y el uso de proteínas chaperonas como fármacos [160]. Mas recientemente Schwartz y su equipo (2012) reportaron el empleo de las CTPi para el estudio del ciclo de vida del virus de la hepatitis C y para la evaluación de la respuesta inflamatoria del huésped ante la infección viral [161]. Este estudio, no sólo ofreció un nuevo modelo para la comprensión de la patogenia de la hepatitis C, sino también sentó las bases para las investigaciones futuras en cuanto al impacto de la genética del paciente en el desarrollo de la infección viral [162].

3.2 Ensayos toxicológicos

La evaluación del perfil de seguridad de los nuevos compuestos candidatos a fármacos es fundamental durante el proceso de I+D. Los problemas asociados a la seguridad, especialmente la hepatotoxicidad, es una de las causas principales de la exclusión de moléculas. Esto no sólo impacta económicamente a la industria farmacéutica, sino en lo más importante, que es la salud de los pacientes [164].

El hígado es el principal órgano blanco de los compuestos tóxicos debido a su inherente participación en la biotransformación de sustancias endógenas y exógenas. Se estima que alrededor del 60% de los reportes de insuficiencia hepática presentados en Estados Unidos en el año del 2012 están relacionados con el uso de medicamentos [163].

El proceso de investigación y desarrollo de medicamentos comienza con la investigación, identificación de blancos terapéuticos y la obtención de moléculas candidatas. A lo largo de la

fase preclínica los compuestos más promisorios sufren modificaciones estructurales y de formulación para optimizar su farmacocinética y farmacodinamia. La evaluación de la toxicidad se realiza paralelamente a esto, empleando métodos de detección basados en ensayos celulares y animales [164].

Los hepatocitos primarios humanos son el estándar de oro para realizar los ensayos *in vitro* de toxicidad, ya que ofrecen una gran similitud con la fisiología humana; sin embargo, éstos se obtienen de forma escasa pues generalmente provienen de fragmentos de tejido de baja calidad (el tejido de alta calidad se reserva para los trasplantes o provienen de cadáveres), tienen un periodo corto de vida dificultando el cultivo y expansión del tejido, y presentan mucha variabilidad funcional entre donadores. Por otro lado, se cuenta con líneas celulares de roedores genéticamente modificadas y hepatocitos humanos inmortalizadas como HeG2/C3A y HepaRG que tienen como ventaja el bajo costo, una mayor reproducibilidad y su facilidad de expansión. A pesar de ello, las células inmortalizadas sólo representan aproximaciones debido a que poseen un perfil funcional incompleto y anomalías genéticas. Las células animales también presentan carencias dadas las variaciones interespecie, lo que dificulta la extrapolación de los resultados [164].

A pesar de que los modelos de estudio previamente expuestos han ido mejorando conforme a los avances tecnológicos, aún son inadecuados para evaluar la toxicidad, lo cual se refleja en el alto índice de eliminación de los compuestos durante los ensayos clínicos y las etapas posteriores a la comercialización del producto. Un ejemplo notable de las consecuencias de las reacciones adversas a medicamentos no identificadas durante los ensayos preclínicos se observa en el caso de la troglitazona que obtuvo la aprobación por la FDA, la cual más tarde fue retirada del mercado tras haberse reportado 90 casos de insuficiencia hepática, 70 de los cuales resultaron en la defunción del paciente o en transplante de hígado [164, 165]. Otro caso se presentó en el 2006 con el estudio clínico fase I, donde se probó el anticuerpo TGN1412 con 6 voluntarios, los cuales después de su primer infusión (con una dosis 500 veces menor que la dosis segura determinada en los ensayos con animales) sufrieron de una falla multi-orgánica catastrófica [166]. Otro ejemplo muy representativo es el caso de la talidomida, la cual no presentó ningún efecto sobre el desarrollo prenatal de roedores, pero

que si causó graves defectos en el desarrollo de los bebés cuyas madres habían tomado este medicamento durante el embarazo con el fin de aliviar las náuseas [167].

Si bien muchas de las reacciones adversas observadas durante la etapa clínica y posteriores se deben a que no se cuenta con modelos *in vitro* e *in vivo* que permitan la extrapolación certera de los resultados, no es la única razón, ya que la variación genética y el historial de exposición al medio ambiente de la población que consume el medicamento es un factor determinante para que se presenten o no las reacciones adversas y en el grado en que lo harán. La predisposición genética hacia la toxicidad de un fármaco puede ser detectada a tiempo si durante el proceso de I+D se introducen ensayos celulares que reflejen la variabilidad genética individual [168].

Con la información anterior, se observa que es necesario la implementación de estudios *in vitro* que permitan la evaluación e identificación de los efectos tóxicos de las moléculas candidatas a fármacos principalmente en los hepatocitos, pero también deben considerarse otras células como cardiomiocitos y neuronas; al igual que, modelos que permitan ver y predecir los efectos teratogénicos, mutagénicos y carcinogénicos. Asimismo, esta nueva tecnología celular debe considerar la información genética de cada población con la finalidad de prevenir cualquier reacción adversa y proporcionar beneficios adicionales como es la disminución de la tasa de eliminación de moléculas, minimizar del uso de modelos animales y la reducción de costos.

Las células diferenciadas a partir de las CTPi ofrecen una excelente alternativa para reemplazar o complementar los experimentos o pruebas ya implementadas para la evaluación del perfil toxicológico durante la fase preclínica del proceso de I+D de medicamentos, ya que con ellas, es posible obtener grandes cantidades de células con un fenotipo estable y con una fisiología prácticamente igual a la del ser humano del cual fue aislada la célula somática, por lo que al mismo tiempo también permite evaluar la contribución genética individual así como su historial de exposición al medio ambiente.

Actualmente se han generado diversas líneas de hepatocitos a partir de CT. Kia, et. al (2012), presenta una recopilación de los estudios más recientes en los que se han derivado

hepatocitos y evaluado su funcionalidad; en esta revisión se señala que al menos 21 grupos de investigación han generado hepatocitos a partir de CT de humanos, de los cuales 8 refieren el uso de CTPi. Estos estudios principalmente se han enfocado en establecer las semejanzas y diferencias funcionales con respecto de los hepatocitos primarios afin de proporcionar modelos bien estandarizados y validados que permitan realizar los estudios toxicológicos de forma confiable [179].

Por otro lado también se han generado modelos para evaluar la cardiotoxicidad, un ejemplo de la importancia del empleo de las CTPi en la evaluación de la cardiotoxicidad se observa con la risperidona, que es un antipsicótico indicado en el tratamiento de la esquizofrenia pero que puede ocasionar anomalías electrofisiológicas cardiacas ya que es un bloqueador del canal iónico de potasio I_{Kr} . Rajamohan y sus colaboradores en el presente año detectaron que la risperidona a una concentración de 0.1 μM provoca un aumento en la duración del potencial de acción de los cardiomiocitos derivados de las CTPi humanas, mientras que los cardiomiocitos de cobayos presentan este efecto a una concentración de 1.0 μM [136].

Como se mencionó anteriormente, distintos grupos de investigación trabajan arduamente por generar modelos de hepatocitos derivados de CT humanas bien estandarizados que permitan evaluar el metabolismo y toxicidad de moléculas; de tal forma que los resultados obtenidos puedan ser extrapolados a los seres humanos con la mayor certeza posible. Sin embargo, uno de los principales problemas que enfrenta la aplicación de las CT en la farmacología y toxicología, es la incapacidad para englobar completamente la variación fenotípica de las enzimas metabólicas claves presentes en la población mundial. Esto podría superarse generando bibliotecas de hepatocitos derivados de CTPi de individuos diferentes que representen la variación fenotípica y genotípica de la población mundial [179]. Fakunle y sus colaboradores (2012) han propuesto generar una colección de las CTPi que representen la diversidad genética de las poblaciones para que posteriormente éstas puedan ser diferenciadas a hepatocitos o cualquier otro linaje celular y permitan un avance significativo en la predicción de la toxicidad y en los conocimientos de farmacogenómica [168]. A la fecha ya se ha realizado la clasificación poblacional de 370 CT pluripotenciales (de las CTE y CTPi) (Fig 13).

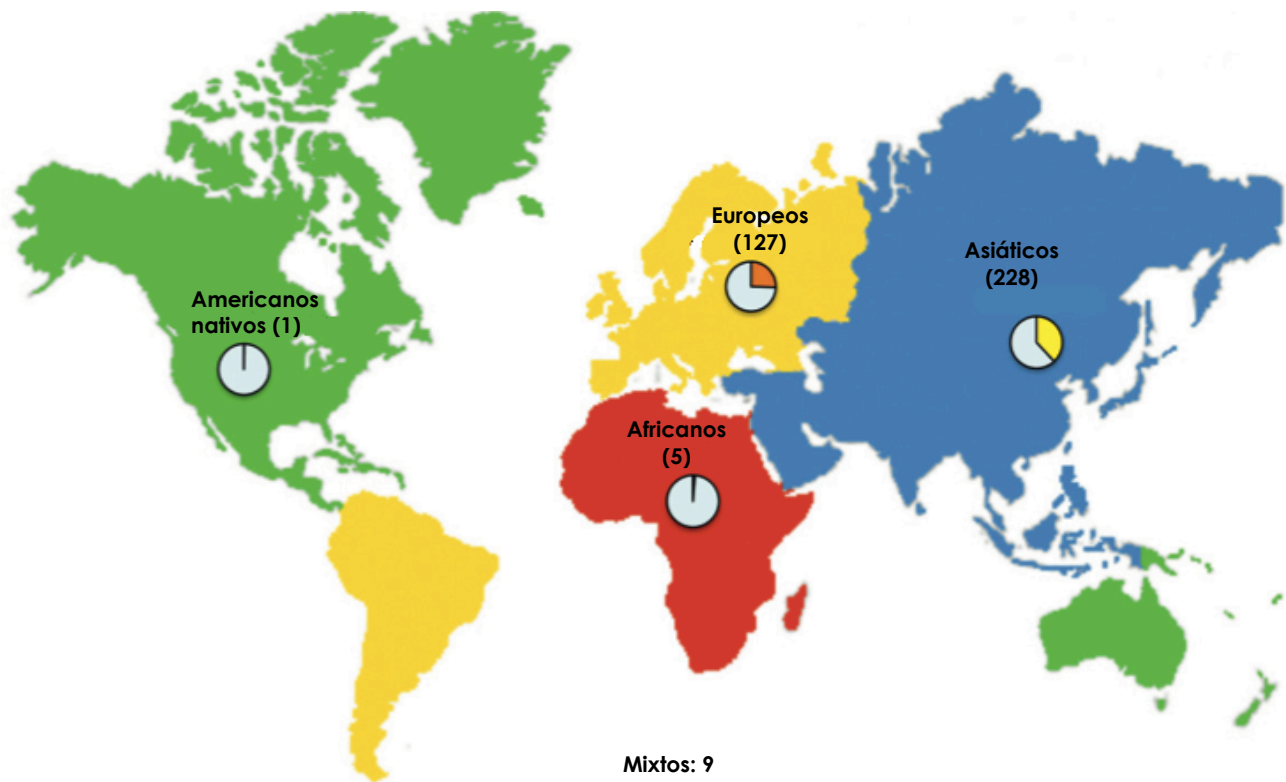


Figura 13. Clasificación poblaciones de las células troncales pluripotenciales. Actualmente se han clasificado 370 células troncales pluripotenciales (de las CTE e CTPi) conforme a su origen poblacional; la gran mayoría son europeo y asiático. El tamaño del segmento de cada gráfico circular estima el porcentaje de las líneas analizadas totales. Modificada de [168]

3.3 Cribado de alto rendimiento de fármacos y medicamentos (*High-throughput screening*)

El descubrimiento de nuevos medicamentos depende en gran medida de la capacidad de la industria farmacéutica para detectar desde un inicio cuál de las todas las moléculas candidatas a fármacos que se encuentran en su “biblioteca” ejercen un efecto terapéutico. Es por ello que la industria farmacéutica ha invertido no solamente en el diseño y descubrimiento de nuevas moléculas que expandan sus colecciones, sino también, en técnicas que permitan probar estas grandes colecciones en distintos tipos celulares para acelerar y hacer más eficiente el proceso de identificación de las moléculas que son biológicamente activas y que desencadenan una respuesta farmacológica. A este tipo de ensayos se les conoce como cribado de alto rendimiento (en inglés, *High-throughput*

screening) pues con ellos es posible probar al menos 200,000 compuestos por día. La automatización de los ensayos mediante la robotización permite aumentar la velocidad [143].

En estos ensayos se emplean líneas celulares recombinantes que fueron transformadas para expresar la diana de interés, sin embargo, no están directamente relacionadas con la enfermedad que se está estudiando. Asimismo, ante las limitaciones de las células primarias y las células inmortalizadas, las CTPi se ofrecen como una gran alternativa, ya que pueden ser propagadas por períodos prolongados de tiempo y pueden diferenciarse a tipos celulares fisiológicamente relevantes (paciente-específicas y enfermedad-específicas) lo que favorecería la creación de “bibliotecas” de células humanas [135]. Por tanto, al tener estas dos bastas bibliotecas se aumentaría la probabilidad de encontrar agentes terapéuticos y de estudiar su toxicidad.

3.3 Las compañías farmacéuticas y la implementación de la tecnología de las células troncales.

A continuación se presentan algunas de las compañías farmacéuticas que a la fecha han implementado la tecnología de las CT dentro de su proceso de I+D de nuevos fármacos y medicamentos:

Tabla 5. Ejemplos de la tecnología de las células troncales en la industria farmacéutica. [170, 180]

Compañía	Año	Descripción	Referencias
Roche en colaboración con la Universidad de Harvard y el Hospital General de Massachusetts	2010	Emplean líneas de células troncales, en especial las CTPI, para la detección de fármacos para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y otras afecciones.	[170]
Pfizer y GE Healthcare en colaboración con ViaCyte, Inc.(antes Novocell) y Geron	2009	Emplean CTE humanas para el tamizaje y descubrimiento de medicamentos.	[170]
Novartis en conjunto con el Instituto de Células Troncales de Harvard (HSCI)	2009	Estudian las enfermedades neuromusculares para encontrar alternativas terapéuticas e incursionan en el campo de la medicina regenerativa	[180]
GlaxoSmithKline con el Instituto de Células Troncales de Harvard (HSCI)	2008	Estudian las enfermedades del corazón, del aparato locomotor, cáncer, diabetes y realizan investigación en neurociencia.	[170]
AstraZeneca en colaboración con Cellartis	2006	Emplean las células troncales en la generación de hepatocitos y cardiomicitos para realizar los ensayos de seguridad.	[170]

CONCLUSIONES

La industria farmacéutica tiene como objetivo principal disminuir la tasa de deserción de fármacos y medicamentos durante todo el proceso de I+D a fin de mantenerse a la vanguardia, presentar las mejores alternativas para suplir las necesidades de salud de los seres humanos y reducir los gastos asociados al proceso de I+D. Para lograr esta meta necesita obtener un equilibrio adecuado entre la eficacia y seguridad de los medicamentos que desarrolla y produce. Se ha observado que los modelos de estudio *in vitro* e *in vivo*, actualmente empleados durante las primeras fases del desarrollo de medicamentos, no presentan características genotípicas y fenotípicas que permitan representar y evaluar el comportamiento de las patologías humanas y su exposición ante distintos compuestos con actividad farmacológica. Es por ello que las CT pluripotenciales, en especial las CTPi, se presentan como una tecnología revolucionaria que facilitará la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en las distintas enfermedades, la identificación de blancos terapéuticos y la generación de bibliotecas que hagan más eficiente el proceso de tamizaje de las moléculas candidatas. Asimismo, permitirán la extrapolación de los resultados obtenidos de los ensayos de seguridad y eficacia durante la fase preclínica lo que disminuirá significativamente los problemas asociados a la ineficacia y toxicidad. Los beneficios anteriormente descritos se potencializan ya que el empleo de estas células permite estudiar paralelamente los factores que contribuyen en la respuesta variable a los fármacos como: origen étnico, género, edad, etapa de desarrollo, historia de exposición ambiental y la variación genética. La tecnología de las CT pluripotenciales es relativamente nueva por lo que existen aún muchos cuestionamientos en relación a la generación y aplicación de las mismas. A pesar de ello, no representan un obstáculo en el proceso de I+D de nuevos fármacos y medicamentos, por el contrario, invitan a la industria farmacéutica a invertir tiempo, dinero y personal en favor de su desarrollo.

REFERENCIAS

1. Lajtha, L. G. (1979). Stem cell concepts. *Differentiation* 14: 23-34.
2. Potten, C. S. y Loeffler M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110: 1001-1020
3. Morrison, S. J., Shah, N. M., & Anderson, D. J. (1997). Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell*, 88: 287-298.
4. Weissman, I. L. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287: 1442-1446.
5. Stem Cell Basics: Introduction. En Stem Cell Information [en línea]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2002 [consultado 23 de enero de 2013] Disponible en: <http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics1.aspx>
6. Donovan, P. J. y Gearhart, J. (2001). The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 414: 92-97.
7. Jaenisch, R. y Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132: 567-582.
8. Carlson, B.M. Embriología Humana y biología del desarrollo Elsevier. Madrid.pp.43-85
9. Rossant, J. (2008). Stem cells and early lineage development. *Cell* 132: 527-531.
10. Brons, I. G., *et al.* (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448: 191-195
11. Tesar, P. J., *et al.* (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448: 196-199.
12. Matsui, Y., Zsebo, K., y Hogan, B. L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70: 841-847.
13. Resnick, J. L., Bixler, L. S., Cheng, L., y Donovan, P. J. (1992). Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*, 359: 550-551
14. Kerr, C. L., Shamblott, M. J., y Gearhart, J. D. (2006). Pluripotent stem cells from germ cells. *Methods Enzymol* 419: 400-426.
15. Guan, K., *et al.* (2006). Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 440: 1199-1203.

-
16. Kanatsu-Shinohara, *et al.* (2004). Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell* 119: 1001-1012.
 17. Seandel, M., *et al.* (2008). Niche players: spermatogonial progenitors marked by GPR125. *Cell Cycle* 7: 135-140.
 18. Takahashi, K., *et al.* (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131: 861-872.
 19. Takahashi, K. y Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676.
 20. Yu, J., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917-1920.
 21. Andrews, P. W. (1998). Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *APMIS* 106: 158-167; discussion 167-158.
 22. Andrews, P. W. (1988). Human teratocarcinomas. *Biochim Biophys Acta* 948: 17-36.
 23. Pera, M. F., Reubinoff, B., y Trounson, A. (2000). Human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 113: 5-10.
 24. Hemberger, M., *et al.* (2008). Stem cells from fetal membranes - a workshop report. *Placenta* 29: S17-19.
 25. Pappa, K. I. y Anagnou, N. P. (2009). Novel sources of fetal stem cells: where do they fit on the developmental continuum?. *Regen Med* 4: 423-433
 26. Young, H. E. y Black, A. C.Jr. (2004). Adult stem cells. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 276: 75-102.
 27. Lukomska, B. (2012) Stem cells and their outstanding concerns. *Journal of Veterinary Ophthalmology* 1: 1-9
 28. Lodi, D., Iannitti, T., y Palmieri, B. (2011). Stem cells in clinical practice: applications and warnings. *J Exp Clin Cancer Res* 30: 9.
 29. Ratajczak, M. Z., *et al.* (2012). Pluripotent and multipotent stem cells in adult tissues. *Adv Med Sci* 57: 1-17.
 30. Jiang, Y., *et al.* (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418: 41-49
 31. Jiang, Y., *et al.* (2002). Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Exp Hematol* 30: 896-904.

-
32. D'Ippolito, G., *et al.* (2004). Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *J Cell Sci* 117: 2971-2981.
 33. Beltrami, A. P., *et al.* (2007). Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* 110: 3438-3446.
 34. Gordon, M. Y. (2008). Stem cells for regenerative medicine-biological attributes and clinical application. *Exp Hematol* 36: 726-732.
 35. Gordon, M. Y., *et al.* (2006). Characterization and clinical application of human CD34+ stem/progenitor cell populations mobilized into the blood by granulocyte colony-stimulating factor. *Stem Cells* 24: 1822-1830.
 36. Kucia, M., *et al.* (2006). A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)SSEA-1(+)Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia* 20: 857-869.
 37. Verfaillie, C. M. (2002). Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol* 12: 502-508.
 38. Dalerba, P., Cho, R. W., y Clarke, M. F. (2007). Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med* 58: 267-284.
 39. He, S., Nakada, D., y Morrison, S. J. (2009). Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu Rev Cell Dev Biol* 25: 377-406.
 40. Morrison, S. J. y Kimble, J. (2006). Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* 441: 1068-1074.
 41. Kirschstein R y Skirboll R. 2001. Stem Cells Progress and Future Research Directions. National Institute of Health.
 42. Arias, M. E. y Felmer, R. (2009). Biología de las células madre embrionarias (ES cells) en distintas especies: potenciales aplicaciones en biomedicina. *Arch Med Vet* 41:185-195
 43. Nombela, C. y Simón, C. (2010) Células madre. Editorial CSCI. Madrid. pp. 98-100
 44. Smith, K. P., Luong, M. X. y Stein, G. S. (2009). Pluripotency: toward a gold standard for human ES and iPS cells. *J Cell Physiol* 220: 21-29.
 45. Azuara, V., *et al.* (2006). Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol* 8: 532-538.

-
46. Bernstein, B. E., *et al.* (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125: 315-326.
 47. Houbaviy, H. B., Murray, M. F. y Sharp, P. A. (2003). Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* 5: 351-358.
 48. Suh, M. R., *et al.* (2004). Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol* 270: 488-498.
 49. Meshorer, E. y Misteli, T.(2006). Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 540-546.
 50. Becker, K. A., *et al.* (2006). Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G1 cell cycle phase. *J Cell Physiol* 209: 883-893.
 51. Ghule, P. N., *et al.* (2007). Cell cycle dependent phosphorylation and subnuclear organization of the histone gene regulator p220(NPAT) in human embryonic stem cells. *J Cell Physiol* 213: 9-17.
 52. Ghule, P. N., *et al.* (2008). Staged assembly of histone gene expression machinery at subnuclear foci in the abbreviated cell cycle of human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16964-16969.
 53. Itskovitz-Eldor, J., *et al.* (2000). Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 6: 88-95.
 54. Trounson, A. (2006). The production and directed differentiation of human embryonic stem cells. *Endocr Rev* 27: 208-219.
 55. Thomson, J. A., *et al.* (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147.
 56. Turetsky, T., *et al.* (2008). Laser-assisted derivation of human embryonic stem cell lines from IVF embryos after preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 23: 46-53.
 57. International Society for Stem Cell Reserch (2006) Guidelines for the Conduct of Human Embryonic Stem Cell Research Versión 1.
 58. NIH Human Embryonic Stem Cell Registry Under Former President Bush (Aug. 9, 2001– Mar. 9, 2009). En Stem Cell Information [en línea]. Bethesda, MD: National Institutes of Health, U.S. Department of Health and Human Services, 2012 [Consultado 08 Abril de 2013]. Disponible en <<http://stemcells.nih.gov/research/registry/Pages/eligibilitycriteria.aspx>>

-
59. Strelchenko, N., Verlinsky, O., Kukhareno, V., y Verlinsky, Y. (2004). Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod Biomed Online* 9(6): 623-629.
 60. Stojkovic, *et al.* (2004). Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. *Stem Cells* 22: 790-797.
 61. Shambloott, M. J., *et al.* (1998). Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13726-13731.
 62. Theise, N. D. (2010). Stem cell plasticity: recapping the decade, mapping the future. *Exp Hematol* 38: 529-539.
 63. Fillimore, H. L. y Wu-Pong, S. (2008). Stem cell technology and drug development- Biopharmaceutical Drug Desing and Development en Biopharmaceutical Drug Design *Human Press*: 175-191
 64. Chaparro, O. y Beltrán, O. (2009). Reprogramación nuclear y células pluripotentes inducidas. *Revista Med* 17: 252-263.
 65. Hochedlinger, K. y Jaenisch, R., (2006). Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* 441: 1061-1067.
 66. Briggs, R. y King, T. J. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 38: 455-463.
 67. Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., y Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.
 68. Patel, M. y Yang, S. (2010). Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev* 6: 367-380.
 69. Han, J. y Sidhu, K. (2011). Embryonic stem cell extracts: use in differentiation and reprogramming. *Regen Med* 6: 215-227.
 70. Yamanaka, S. y Blau, H. M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature* 465: 704-712.
 71. Wernig, M., Meissner, A. Cassady, J. P., y Jaenisch, R. (2008). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2: 10-12.
 72. Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448: 313-317.
 73. Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., y Hochedlinger, K. (2008). yInduced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322: 945-949.

-
74. Yu, J., *et al.* (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science* 324: 797-801.
75. 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: 348-362.
76. Okita, K., Nakagawa, M., Ichisaka, T., y Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science* 322: 949-953.
77. Kaji, K., *et al.* (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458: 771-775.
78. Woltjen, K., *et al.* (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458: 766-770.
79. Jia, F., *et al.* (2010). A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells. *Nat Methods* 7: 197-199.
80. Narsinh, K. H., *et al.* (2011). Generation of adult human induced pluripotent stem cells using nonviral minicircle DNA vectors. *Nat Protoc* 6: 78-88.
81. Li, Z., Yang, C. S., Nakashima, K., y Rana, T. M. (2011). Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation. *EMBO J* 30: 823-834.
82. Lin, S. L., *et al.* (2008). Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA* 14: 2115-2124.
83. Yang, C. S. (2011). microRNAs modulate iPS cell generation. *RNA* 17: 1451-1460.
84. Bosnali, M. y Edenhofer, F. (2008). Generation of transducible versions of transcription factors Oct4 and Sox2. *Biol Chem* 389: 851-861.
85. Kim, D., *et al.* (2009). Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins. *Cell Stem Cell* 4: 472-476.
86. Zhou, H., *et al.* (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4: 381-384.
87. Chen, T., *et al.* (2011). Rapamycin and other longevity-promoting compounds enhance the generation of mouse induced pluripotent stem cells. *Aging Cell* 10: 908-911.
88. Huangfu, D., Maehr, R., *et al.* (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* 26: 795-797.

-
89. Wang, Q., *et al.* (2011). Lithium, an anti-psychotic drug, greatly enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Res* 21: 1424-1435.
 90. Gersting, S. W., *et al.* (2004). Gene delivery to respiratory epithelial cells by magnetofection. *J Gene Med* 6: 913-922.
 91. Lee, C. H., *et al.* (2008). Simple, efficient, and reproducible gene transfection of mouse embryonic stem cells by magnetofection. *Stem Cells Dev* 17: 133-141.
 92. Lee, C. H., *et al.* (2011). The generation of iPS cells using non-viral magnetic nanoparticle based transfection. *Biomaterials* 32: 6683-6691.
 93. Brock, A., *et al.* (2012). Cellular reprogramming: a new technology frontier in pharmaceutical research. *Pharm Res* 29: 35-52.
 94. Yamanaka, S. (2009). A fresh look at iPS cells. *Cell* 137: 13-17.
 95. Pera, M. F. y Tam, P. P., (2010). Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature* 465: 713-720
 96. Welstead, G. G., Schorderet, P. y Boyer, L. A. (2008). The reprogramming language of pluripotency. *Curr Opin Genet Dev* 18: 123-129.
 97. Schuettengruber, B., Chourrout, D., Vervoort, M., Leblanc, B., y Cavalli, G. (2007). Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* 128: 735-745.
 98. Moore, K. A. y Lemischka, I. R. (2006). Stem cells and their niches. *Science* 311: 1880-1885.
 99. Ferrari, G., *et al.* (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279: 1528-1530.
 100. Gussoni, E., *et al.* (1999). Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401: 390-394.
 101. Orlic, D., *et al.* (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410: 701-705.
 102. Jackson, K. A., *et al.* (2001). Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107: 1395-1402.
 103. Grant, M. B., *et al.* (2002). Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 8: 607-612.

-
104. Mezey, E., Chandross, K. J., Harta, G., Maki, R. A., y McKercher, S. R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290: 1779-1782.
 105. Brazelton, T. R., Rossi, F. M., Keshet, G. I., y Blau, H. M. (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290: 1775-1779.
 106. Krause, D. S., *et al.* (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105: 369-377.
 107. Petersen, B. E., *et al.* (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284: 1168-1170.
 108. Lagasse, E., *et al.* (2000). Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6: 1229-1234.
 109. Vierbuchen, T., *et al.* (2010). Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature* 463: 1035-1041.
 110. Jin, K. y Galvan, V. (2007). Endogenous neural stem cells in the adult brain. *J Neuroimmune Pharmacol* 2: 236-242.
 111. Taupin, P. (2006). Neural progenitor and stem cells in the adult central nervous system. *Ann Acad Med Singapore* 35: 814-820.
 112. Barker, N., van de Wetering y M., Clevers, H. (2008). The intestinal stem cell. *Genes Dev* 22: 1856-1864.
 113. Yen, T. H. y Wright, N. A., (2006). The gastrointestinal tract stem cell niche. *Stem Cell Rev* 2: 203-212.
 114. Zhang, L., Theise, N., Chua, M., y Reid, L. M.(2008). The stem cell niche of human livers: symmetry between development and regeneration. *Hepatology* 48: 1598-1607.
 115. Ohshima, M. (2007). Hair follicle bulge: a fascinating reservoir of epithelial stem cells. *J Dermatol Sci* 46: 81-89.
 116. Tiede, S., *et al.* (2007). Hair follicle stem cells: walking the maze. *Eur J Cell Biol* 86: 355-376.
 117. Yin, H., Price, F., y Rudnicki, M. A. (2013). Satellite cells and the muscle stem cell niche. *Physiol Rev* 93: 23-67.
 118. Morgan, J. E. y Partridge, T. A., (2003). Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol* 35: 1151-1156.

-
119. Nwajei, F. y Konopleva, M. (2013). The bone marrow microenvironment as niche retreats for hematopoietic and leukemic stem cells. *Adv Hematol* 2013: 953982.
 120. Waheeb, R. y Hofmann. M. C. (2011). Human spermatogonial stem cells: a possible origin for spermatocytic seminoma. *Int J Androl* 34(4 Pt 2): e296-305; discussion e305.
 121. de Rooij, D. G. (2009). The spermatogonial stem cell niche. *Microsc Res Tech* 72: 580-585.
 122. Paul, S. M., et al. (2010). How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov* 9: 203-214.
 123. Sartipy, P., P. Bjorquist, Strehl, R., & Hyllner (2007). The application of human embryonic stem cell technologies to drug discovery. *Drug Discov Today* 12: 688-699.
 124. Mendoza, N. (2008). *Farmacología médica* Editorial Médica Panamericana. México. pp. 138-144
 125. Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica, CANIFARMA (s.f.). Investigación y Desarrollo (I&D). Consultado el 14 de mayo de 2013 de <http://www.canifarma.org.mx/investigacionydesarrollo.html>
 126. Hernández, G. *et al.* (2010) *Tratado de Medicina Farmacéutica* Editorial Médica Panamericana. España. pp.175-187
 127. Norma Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2012, Instalación y operación de la farmacovigilancia
 128. The Pharmaceutical Research and Manufacturers of America, PhRMA (2013). *Clinical Trials: The Phases of Drug Testing and Approval*. Recuperado el 23 de mayo de 2013, de <http://www.phrma.org/innovation/clinical-trials>
 129. Center for Drug Evaluation and Research, FDA (2012). *Novel New Drugs Summary 2012*. Recuperado el 25 de mayo de 2013, de <http://www.fda.gov/drugs/developmentapprovalprocess/druginnovation/default.htm>
 130. Bunnage, M. E. (2011). Getting pharmaceutical R&D back on target. *Nat Chem Biol* 7: 335-339.
 131. Kramer, J. A., Sagartz, J. E., y Morris, D. L. (2007). The application of discovery toxicology and pathology towards the design of safer pharmaceutical lead candidates. *Nat Rev Drug Discov* 6(8): 636-649.

-
132. Organización Panamericana de la Salud (2011). Buenas Prácticas de Farmacovigilancia. Recuperado el 26 de mayo de 2013, de <http://www2.paho.org/hq/dmdocuments/2011/Technical-Doc-5-web.pdf>
133. Muthas, D., Boyer, S. y Hasselgren, C. (2013). A critical assessment of modeling safety-related drug attrition *Med. Chem. Commun.*
134. Song, M., Paul, S., Lim, H., Dayem, A. A., y Cho, S. G. (2012). Induced pluripotent stem cell research: a revolutionary approach to face the challenges in drug screening. *Arch Pharm Res* 35: 245-260.
135. Hook, L. A. (2012). Stem cell technology for drug discovery and development. *Drug Discov Today* 17: 336-342.
136. Rajamohan, D., et al. (2013). Current status of drug screening and disease modelling in human pluripotent stem cells. *Bioessays* 35: 281-298.
137. Zhu, H., Lensch, M. W., Cahan, P., y Daley, G. Q. (2011). Investigating monogenic and complex diseases with pluripotent stem cells. *Nat Rev Genet* 12: 266-275.
138. Davis, R. P., van den Berg, C. W., Casini, S., Braam, S. R., y Mummery, C. L. (2011). Pluripotent stem cell models of cardiac disease and their implication for drug discovery and development. *Trends Mol Med* 17: 475-484.
139. Doevendans, P. A., Daemen, M. J., de Muinck, E. D., y Smits, J. F. (1998). Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovasc Res* 39: 34-49
140. Morano, I. (1999). Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains. *J Mol Med (Berl)* 77: 544-555.
141. Lyons, G. E., Schiaffino, S., Sassoon, D., Barton, P., y Buckingham, M (1990). Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J Cell Biol* 111: 2427-2436.
142. Ebert, A. D. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457: 277-280.
143. Golz, S., Geert, A. y Wilmen, A. (2011) Adult stem cells in drug discovery. *Stem cell Engineering* pp. 465
144. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM: #143100. Actualizado el 23 de abril de 2013, de <http://www.omim.org/entry/143100>

-
145. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM: #168600. Actualizado el 7 de marzo de 2013, de <http://www.omim.org/entry/168600>
146. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM: #104300. Actualizado el 23 de abril de 2013, de <http://www.omim.org/entry/104300>
147. Doss, M.X, Antzelevitch, C. y Sachinidis, A. (2012) Human induced pluripotent stem cells: role in patient-specific drug discovery. *Stem Cells and Cancer Stem cells. Therapeutic Applications in Disease and Injury*. Vol. 3. Springer Netherlands, pp. 257-263
148. Lunn, M. R. y Wang, C. H. (2008). Spinal muscular atrophy. *Lancet* 371: 2120-2133.
149. Ebert, A. D., *et al.* (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature* 457(7227): 277-280.
150. Marchetto, M. C., *et al.* (2010). A model for neural development and treatment of Rett syndrome using human induced pluripotent stem cells. *Cell* 143: 527-539.
151. Walsh, R. M. y Hochedlinger K. (2010). Modeling Rett syndrome with stem cells. *Cell* 143: 499-500.
152. Gelb, B.D. y Tartaglia, M. LEOPARD Syndrome. En: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, *et al.*, editors. GeneReviews™ [En línea]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2013. Consultado el 05 de junio de 2013. En: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1383/>
153. Carvajal-Vergara, X., *et al.* (2010). Patient-specific induced pluripotent stem-cell-derived models of LEOPARD syndrome. *Nature* 465: 808-812.
154. Maehr, R., *et al.* (2009). Generation of pluripotent stem cells from patients with type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 15768-15773.
155. Rashid, S. T., *et al.* (2010). Modeling inherited metabolic disorders of the liver using human induced pluripotent stem cells. *J Clin Invest* 120: 3127-3136.
156. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM: #613490. Actualizado el 18 de abril de 2013, de <http://www.omim.org/entry/613490>
157. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM: #143890. Actualizado el 09 de febrero de 2012, de <http://www.omim.org/entry/143890>
158. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. Numero MIM: #232200. Actualizado el 28 de septiembre de 2012, de <http://www.omim.org/entry/232200>
-

-
159. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM®. Johns Hopkins University, Baltimore, MD. Numero MIM: #277900. Actualizado el 01 de noviembre de 2011, de <http://www.omim.org/entry/277900>
160. Zhang, S., *et al.* (2011). Rescue of ATP7B function in hepatocyte-like cells from Wilson's disease induced pluripotent stem cells using gene therapy or the chaperone drug curcumin. *Hum Mol Genet* 20: 3176-3187.
161. Schwartz, R. E., *et al.* (2012). Modeling hepatitis C virus infection using human induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 2544-2548.
162. Yi, F., Liu, G. H., y Izpisua Belmonte, J. C. (2012). Human induced pluripotent stem cells derived hepatocytes: rising promise for disease modeling, drug development and cell therapy. *Protein Cell* 3: 246-250.
163. Lee, W.M., Drug-induced Liver Injury and Hepatic Encephalopathy [en línea]. DILI Pharma/FDA/Academy Meeting No. 12. Marzo 2013. Consultado el 08 de junio de 2013. Disponible en: http://www.aasld.org/dili/Documents/2013/3B_1_W_Lee-n%20.pdf
164. Greenhough, S. y Hay, D.C. (2012). Stem cell-based toxicity screening. Recent Advances in Hepatocyte Generation. *Pharm Med* 26:85-89
165. Gale, E. A. (2001). Lessons from the glitazones: a story of drug development. *Lancet* 357: 1870-1875.
166. Attarwala, H. (2010). TGN1412: From Discovery to Disaster. *J Young Pharm* 2: 332-336.
167. Kumar, N., Sharma, U., Singh, C., y Singh, B. (2012). Thalidomide: chemistry, therapeutic potential and oxidative stress induced teratogenicity. *Curr Top Med Chem* 12(13): 1436-1455.
168. Fakunle, E. S. y Loring, J. F. (2012). Ethnically diverse pluripotent stem cells for drug development. *Trends Mol Med* 18: 709-716.
169. Wagers, A. J. (2012). The stem cell niche in regenerative medicine. *Cell Stem Cell* 10: 362-369.
170. Baker, M. (2010). Testing time for stem cells. *Nature* 463: 719.
171. Preventable Adverse Drug Reactions: A Focus on Drug Interactions. En U.S. Food and Drug Administration [en línea] Consultado el 31 Agosto de 2013. Disponible en <<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DevelopmentResources/DrugInteractionsLabeling/ucm110632.htm>>
-

-
172. Yu, D. X., Marchetto, M. C., y Gage, F. H. . (2013). Therapeutic translation of iPSCs for treating neurological disease. *Cell Stem Cell* 12: 678-688.
173. Park, I. H., *et al.* (2008). Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 134: 877-886.
174. An, M. C., *et al.* (2012). Genetic correction of Huntington's disease phenotypes in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 11: 253-263
175. Nguyen, H. N., *et al.* (2011). LRRK2 mutant iPSC-derived DA neurons demonstrate increased susceptibility to oxidative stress. *Cell Stem Cell* 8: 267-280.
176. Yagi, T., *et al.* (2011). Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* 20: 4530-4539.
177. Kondo, T., *et al.* (2013). Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular Abeta and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell* 12: 487-496.
178. Brennand, K. J., *et al.* (2011). Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature* 473: 221-225.
179. Kia, R., *et al.* (2012) Stem cell-derived hepatocytes as a predictive model for drug-induced liver injury: are we there yet. *BJCP* 75: 885-896.
180. HSCI and Novartis begin collaboration [en línea]. Harvard Stem Cell Institute. Noviembre 2009. [Consultado el 08 de septiembre de 2013]. Disponible en: <http://www.hsci.harvard.edu/newsroom/hsci-and-novartis-begin-collaboration>