



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES
INDUCIDAS (iPS) Y SUS PERSPECTIVAS DE APLICACIÓN EN MEDICINA
VETERINARIA DE PEQUEÑAS ESPECIES.
ESTUDIO RECAPITULATIVO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

BRENDA ODET LIMÓN CRUZ

ASESORES

MVZ. Santiago René Anzaldúa Arce

MVZ. Héctor Villaseñor Gaona



Ciudad de México

2021



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.

DEDICATORIAS

A mi madre Claudia Limón por su amor y su esfuerzo, por siempre ser valiente ante cualquier prueba y seguir luchando por nosotros. Sin tu ayuda esto no sería posible y todo te lo debo a ti. Te agradezco por ser la mejor mamá. Te amo.

A mi hermana Karen por ser mi compañera en esta vida y mi cómplice de aventuras.

A mi hermano Luis Arturo porque tu llegada solamente nos ha demostrado que existen regalos que te cambian la vida y te recuerdan lo bonita que es. Y sobre todo porque eres la inspiración para ser mejor todos los días.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Santiago Anzaldúa quien es un gran doctor y sobre todo una gran persona, le agradezco por su paciencia y su compromiso, ya que siempre estuvo al pendiente, dispuesto a resolver mis dudas y ayudarme y quien fue un gran guía para concluir este trabajo.

Al doctor Héctor Villaseñor por darme la oportunidad de realizar esta tesis, resolver mis dudas, su ayuda para desarrollarla y terminarla.

A mis sinodales por el tiempo dedicado a la revisión de mi tesis y por darme la oportunidad de presentarla.

Agradecemos el apoyo para la realización de este trabajo a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM y en particular al Proyecto PAPIIT IN: 223520, Titulado “Caracterización histomorfológica y análisis inmunohistoquímico de células con marcadores de pluripotencia en órganos del tracto reproductor de perras de diferentes edades”

CONTENIDO

RESUMEN.....	1
1. Introducción	2
2. Procedimiento	6
3. Características generales de las células troncales.....	7
4. Células troncales embrionarias.....	8
5. Células troncales del adulto (ASC).....	12
6. Células troncales pluripotentes inducidas (iPSC)	15
6.1 Antecedentes históricos.....	16
6.2 Procedimientos para obtener las iPSC	21
7. Reprogramación nuclear.....	24
7.1 Transferencia nuclear de células somáticas (SCNT).....	24
7.2 Formación de teratomas.....	25
7.3 Formación de animales quimera.....	26
7.4 Integración tetraploide.....	26
7.5 Etapas de la reprogramación para la generación de iPS.....	27
7.5.1 Etapa I: Expresión forzada de los genes.....	27

7.5.2 Etapa II: Comienzo del cambio irreversible.....	28
7.5.3 Etapa III: iPS maduras... ..	28
7.5.4 Etapa IV: Consolidación de la reprogramación.....	29
8. Mecanismos epigenéticos en la formación de iPS.....	30
8.1 Metilación del ADN	31
8.2 Modificación covalente de las histonas	32
8.3 Participación de los miRNA en la reprogramación de iPSCs.....	33
9. Perspectivas de utilización de iPSC en medicina veterinaria	34
9.1 Modelos animales para diversas enfermedades... ..	35
9.2 Investigación de fármacos.....	36
9.3 Terapia celular para diversas enfermedades... ..	36
10. iPSC en pequeñas especies.....	37
10.1 Obtención de iPSC en perros y gatos	37
10.2 Perspectivas de aplicación en medicina veterinaria de pequeñas especies... ..	38
10.3 Ventajas de la utilización de iPSC en medicina veterinaria regenerativa	40
10.4 Desventajas y retos en la utilización de iPSC en medicina	

veterinaria.....	43
11. Conclusiones	49
12. Referencias.....	52

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Formación del blastocisto y sus partes.....	9
Imagen 2. Derivación de las células del embrioblasto	11
Imagen 3. Obtención de células iPSC en medicina veterinaria para el beneficio humano	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Células madre pluripotentes inducidas caninas (ciPSCs) generadas a partir de células caninas. Utilizando retrovirus y lentivirus como método de reprogramación	22
Tabla 2. Estudios que utilizan células madre pluripotentes inducidas (iPSC) con enfoques terapéuticos	35

RESUMEN

Las células troncales, se caracterizan por dos propiedades fundamentales la capacidad de autorrenovación y la de generar diferentes tipos de células diferenciadas. Se clasifican por su origen en tres grupos: células troncales embrionarias (ESC), las células troncales del adulto o células somáticas (ASC) y las células troncales pluripotentes inducidas (iPS, por sus siglas en inglés, *induced Pluripotent Stem Cells*). En 2006, Shinya Yamanaka presentó un nuevo concepto de reprogramación utilizando la expresión retroviral de cuatro factores de transcripción clave Sox-2, Oct4, Klf4 y c-Myc) que son capaces de reprogramar a las células somáticas a un estado pluripotencial. Estas representan un componente clave de una generación emergente de modelos de órganos y tejidos fisiológicamente representativos y a diferencia de las células ESC las células IPS pueden generarse a partir de células somáticas propias del paciente liberándose así de problemas éticos. En el presente estudio se realizó una investigación bibliográfica mediante varias fuentes: buscadores en internet: Googlee Scholar, Science Direct y PubMed. Las bases de datos utilizadas serán: EBSCO y Ovid. Las palabras claves utilizadas serán: “stem cells”, “induced Pluripotent stem Cells” “regenerative veterinary medicine” “dog” and “cat”. Se resumen las características de los principales tipos de células troncales, el desarrollo y las técnicas de obtención de iPSC, las posibles aplicaciones de las iPSC en humanos y se analizan los retos y limitaciones de su uso futuro en la medicina regenerativa de las pequeñas especies.

1. Introducción

Las células troncales, son un tipo de células que se caracterizan por la capacidad de autorrenovación y de generar diferentes tipos de células diferenciadas. Se clasifican por su origen en tres grandes grupos: Las células troncales embrionarias (ESC por sus siglas en inglés, *Embryonic Stem Cells*), las células troncales del adulto o células somáticas (ASC por sus siglas en inglés, *Adult Stem Cells*), que en realidad comprende células troncales posnatales y las células troncales pluripotentes inducidas (iPS, por sus siglas en inglés, *induced Pluripotent Stem Cells*). (1)

De acuerdo a su potencial de diferenciación las células pueden ser: totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales, oligopotenciales, bipotenciales y unipotenciales. (1)

En mamíferos, específicamente el cigoto y los blastómeros tempranos son totipotenciales y pueden generar todo el organismo incluyendo tejidos extraembrionarios. Las células ESC son un ejemplo de células pluripotenciales que tienen la capacidad de autoregeneración y de generar los 220 tipos células que constituyen un organismo, sin embargo no son capaces de general el trofoblasto y en general los tejidos extraembrionarios .

Las células multipotenciales como las células troncales hematopoyéticas pueden dar origen a todos los elementos de la sangre.

Las células troncales espermatogoniales son un tipo de células unipotenciales lo cual significa que sólo pueden dar origen a cierto tipo de células, en este caso a los espermatozoides. (1)

En los últimos años la ciencia ha tenido grandes avances para tratar de responder una de las preguntas más fascinante en Biología: como el huevo o

cigoto utiliza su información genética para producir 220 tipos células diferentes que conforman a todos los órganos y tejidos de nuestro cuerpo. (2)

Durante los años de 1950 y 1960, dos investigadores Briggs y King (3) establecieron la técnica de transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, por sus siglas en inglés: “Somatic Cells Nuclear Transfer”) o “clonación” para probar el potencial del desarrollo del núcleo de embriones en estado tardío, aislados y transplantados en ovocitos previamente enucleados. (Briggs y King 1952 y 1957). (4) Después de este primer experimento, el inglés Sir Jhon Gurdon (Gurdon 1961) (5) demostró la diferenciación de células de anfibio completamente diferenciadas, como es el caso de células intestinales que retienen la información necesaria para soportar el desarrollo embrionario de ranas clonadas. La mayor conclusión de estos experimentos fue que el desarrollo impone cambios epigenéticos antes que cambios genéticos irreversibles durante la diferenciación celular (Hochedlinger and Jaenisch 2010). (6) La clonación de Dolly (Wilmut 1997) (7) y otros mamíferos a partir de células totalmente diferenciadas y comprometidas (Eggan 2004; Inoue 2005) (8) permanece en realidad potencialmente totipotente, pues puede soportar el desarrollo de todo el organismo y sus anexos extraembrionarios, así se demostró que las células completamente diferenciadas no se fijan de manera irreversible sino que se pueden recuperar un estado embrionario programado que es capaz de dirigir el desarrollo de un nuevo organismo. Una de las cuestiones clave planteadas por la clonación nuclear, se relaciona con el mecanismo de reprogramación que poseen estas células, ya que se tratan de definir los “Factores de reprogramación” que se encuentran en el citoplasma del huevo los cuales convierten el epigenoma de una célula somática al de una célula embrionaria.

Desafortunadamente la mayoría de los animales clonados muestran desde sutiles a severas anomalías fenotípicas y genéticas, sugiriendo que la aplicación de la técnica por SCNT resulta en fallas en la reprogramación (9).

En 2006, Shinya Yamanaka presentó un nuevo concepto de reprogramación utilizando la expresión retroviral de cuatro factores de transcripción clave que son capaces de reprogramar a las células somáticas a un estado pluripotencial similar al de las ESC. (11)

Este trabajo pionero realizado en ratones, en los últimos años, se ha estudiado y modificado por diversas técnicas y se ha adaptado para la generación de iPSC humanas, siendo actualmente una gran promesa en la medicina regenerativa. Incluso si se considera que estas células iPSC comparten la mayoría de sus características moleculares con las células ESC, aún estamos lejos de proporcionar un concepto conciso de cómo la reprogramación utiliza los factores de Yamanaka (Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc) o los factores de Thomson (Oct4, Sox2, Nanog, Lin28) y cómo funcionan para explicar cabalmente los mecanismos moleculares que poseen. (11)

La tecnología iPSC humana, que ha evolucionado rápidamente desde 2007, ha iniciado una nueva era para los campos de la biología en cuanto a las células troncales y la medicina regenerativa, así como en los campos en el modelo de diversas enfermedades y el descubrimiento, funcionamiento y desarrollo de fármacos.

Con el desarrollo de esta tecnología, las iPSC humanas pueden tener gran aplicación en los modelos experimentales en cuanto a enfermedades humanas y se utilizaron para la detección de fármacos, la eficacia y las posibles toxicidades. Estas ventajas incluyen su origen humano, su accesibilidad, capacidad de expansión, capacidad para dar lugar a casi todos los tipos de células deseados, evitar las preocupaciones éticas asociadas con la utilización de ESC humanas, que implican la destrucción del embrión humano; así mismo desarrollar el potencial para desarrollar una medicina personalizada pudiendo así utilizar iPSC específicas del paciente.

Además, los recientes avances tecnológicos de edición de genes, en particular, la tecnología CRISPR – Cas9 -, ha permitido la creación de iPSC derivadas del paciente y posteriormente la generación iPSC isogénicos como controles utilizando la edición de genes, y diferenciarlas posteriormente en los tipos celulares requeridos por el paciente resultando células en las que pueden identificarse fenotipos especializados de acuerdo a la enfermedad, para conocer nuevos mecanismos patológicos, que permitan el desarrollo de fármacos, para corregir mutaciones causantes de la enfermedad y generar una medicina personalizada para el paciente.

Los iPSC también son componente clave de una generación emergente de modelos de órganos y tejidos fisiológicamente representativos con características de histoarquitectura similares a estos, llamados “organoides”, a través de la utilización de iPSC en cultivos tridimensionales. (12)

La tecnología iPSC también ha atraído un considerable interés debido a su aplicación en la medicina regenerativa.

El primer estudio clínico en humanos para evaluar las células iPSC se realizó en el año 2014. Este estudio utilizó un pigmento derivado del epitelio de la retina proveniente de iPSC humano (RPE) utilizando células para tratar la regeneración macular observando una mejoría en la visión del paciente, posteriormente el juicio quedó en suspenso debido a la identificación de dos variantes genéticas en los iPSC y se prevé reanudar en un segundo paciente.

Claramente, la tecnología iPSC humana es una gran promesa para el modelado de enfermedades humanas, el descubrimiento de fármacos y la base para una terapia basada en células; potencial que apenas está comenzando. En este artículo, se ofrece una visión general del avance en cada una de las principales aplicaciones de iPSCs en más de una década transcurrida desde el descubrimiento de esta poderosa tecnología.

En medicina veterinaria se han hecho esfuerzos en la generación de las iPS en diversas especies, entre ellas los perros y gatos, que tienen particular importancia clínica y en el ámbito de la medicina veterinaria regenerativa.

Una de las grandes ventajas de las iPS es que pueden generarse a partir de cualquier tipo de célula inicial y reintroducir en el donante, lo que permite el trasplante autólogo sin las preocupaciones prácticas o éticas de las ESC y EpiSCS (células troncales embrionarias derivadas del epiblasto) que existe en el humano.

La utilización de las iPS en pequeñas especies puede generar una poderosa estrategia con aplicaciones terapéuticas en diversas enfermedades que los perros y gatos comparten con el ser humano y sin las desventajas que implica el tratamiento de personas.

En este estudio recapitulativo, se hará un resumen histórico en el desarrollo de la tecnología de las iPS, las principales características de la reprogramación nuclear, el desarrollo del iPS en pequeñas especies, las principales ventajas, los riesgos, limitaciones y los retos futuros en la utilización de estas células en el modelaje de enfermedades, pruebas de fármacos y terapia celular en la medicina veterinaria regenerativa de pequeñas especies.

2. Procedimiento

Se realizará una búsqueda de la información en dos fuentes: la primera será a través de libros especializados sobre el tema y la segunda en artículos científicos publicados en revistas indexadas.

Para la primera parte de este trabajo sobre las generalidades de las células troncales y sus distintas variedades se hará referencia a conceptos generales sobre células troncales y sus variedades, se buscará la información pertinente

principalmente en libros especializados provenientes de la biblioteca “MV José de La Luz Gómez” de la FMVZ de la UNAM. Los criterios de selección para los libros serán: título (correspondientes al grado de especialización del texto), año de publicación, utilizando los más recientes a los que se puede acceder al momento de la elaboración del trabajo.

Para la segunda parte de este trabajo referente a las iPS (métodos de obtención, antecedentes históricos, modificaciones epigenéticas durante la reprogramación, perspectivas y retos y el empleo de iPS en la medicina veterinaria regenerativa de pequeñas especies), se utilizaron artículos indexados especializados en el tema de las iPS y sus aplicaciones en medicina veterinaria regenerativa, así como retos y limitaciones del uso de las iPS), se realizó mediante los siguientes buscadores en internet: Googlee Scholar, Science Direct y PubMed. Las bases de datos utilizadas serán: EBSCO y Ovid. Las palabras claves utilizadas serán: “Stem Cells”, “induced Pluripotent Stem Cells”, “regenerative veterinary medicine”, “dog”, “cat”.

Se seleccionaron aquellos artículos publicados en revistas indexadas de preferencia entre los años 2006-2020, además de incluir algunos artículos clásicos por su importancia científica e histórica.

3. Características generales de las células troncales.

Las células troncales se definen como células indiferenciadas o inmaduras que poseen la capacidad de renovarse a sí mismas de manera indefinida, generando células exactamente igual a ellas o generando células distintas, pudiendo dar origen a cualquier tipo de célula del organismo adulto. (13)

Las células troncales dan origen a los linajes de distintos tipos de células para la formación de órganos y tejidos del organismo adulto siendo estos linajes cada vez más especializados o diferenciados. (13)

Estos linajes finalmente llevan a la formación de un tipo celular con mayor especialización (diferenciación terminal) con lo cual la capacidad de multiplicación mitótica se ve disminuida. (13)

De acuerdo a su origen las células troncales pueden dividirse en dos grandes grupos; células troncales embrionarias y células troncales adultas. La diferencia entre estos dos tipos de células radica principalmente en el grado de indiferenciación o potencialidad que poseen lo cual les da la capacidad para generar diferentes tipos celulares. (14)

4. Células troncales embrionarias

Las células derivadas de las primeras tres divisiones mitóticas del huevo o cigoto son células totipotentes y contienen 8 blastómeras las cuales en esta etapa podrían dar origen a un embrión completo y sus anexos extraembrionarios (amnios, alantoides y saco vitelino). (13)

Este tipo de células totipotenciales poseen la capacidad de originar todas las células del embrión con esto nos referimos a que pueden dar origen a los tres tipos de células de las hojas blastodérmicas: ectodermo, endodermo y mesodermo a los tejidos extra embrionarios (saco vitelino, alantoides y amnios) y a las células germinales. Sin embargo, una limitante que presenta este tipo de células es que poseen una autorrenovación muy limitada. (14)

Las células que se encuentran presentes en la mórula son células pluripotentes con un número mayor a 8 células (16, 32, 64) las cuales aunque morfológicamente no se pueden diferenciar de las células totipotentes no darían origen a un embrión completo y sus anexos. Estas células únicamente podrían originar al embrión correspondiente a masa celular interna (MCI) la cual corresponde al embrioblasto (células pluripotentes) y a una capa externa de células correspondiente al trofoblasto (células multipotentes). (13)

Después de la mórula se produce el blastocisto el cual consta de alrededor de 100 células y posee una cavidad llamada blastocele la cual divide a la masa celular

interna (MCI) correspondiente al embrioblasto formado por aproximadamente 30 células y las células restantes las cuales corresponden al trofoblasto. (13) (Imagen número 1)

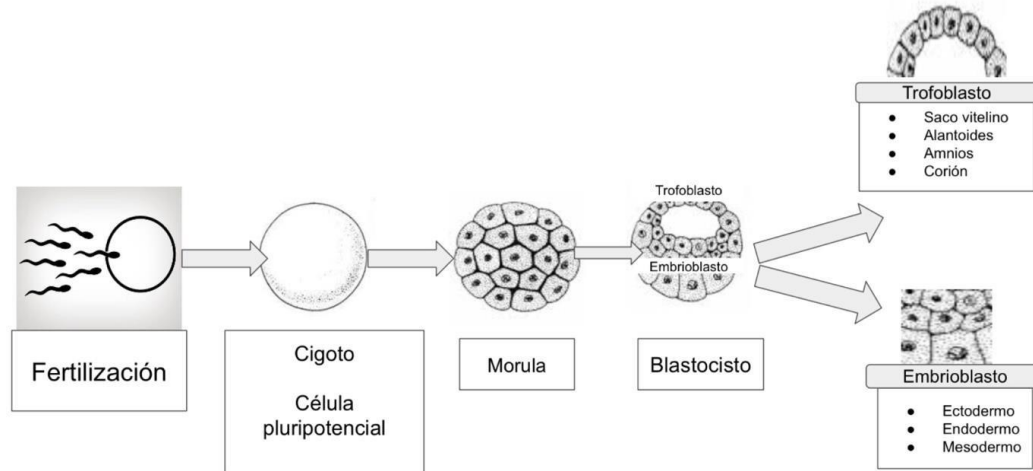


Imagen número 1. Formación del blastocisto y sus partes. (13)

Cuando las células de la masa celular interna (MCI) correspondientes al embrioblasto son extraídas y puestas en un cultivo, son llamadas células troncales embrionarias (ESC). (13)

Una de las formas de obtener las células de la (MCI) es mediante inmunocirugía la cual consiste en crear anticuerpos contra las células del trofoblasto, MCI o epiblasto provocando de esta manera una reacción (antígeno anticuerpo) contra estas y posteriormente su destrucción mediada por el complemento, quedando solamente las células de interés. En el caso del embrioblasto, al separar los remanentes de las células trofoblasticas, las células del MCI se colocan sobre células nodrizas y de 9 a 15 días después se forman colonias redondas y compactas que pueden ser aisladas para la realización y utilización de subcultivos. (13) (14)

Otra forma es la obtención de los blastocistos en la cual se realizan lavados del útero con un amortiguador de fosfato salino de Dubelcco (DPBS) o con algún

medio de cultivo que contenga suero fetal bovino. Después los blastocistos completos son transferidos a células nodrizas que secreten Factor Inhibidor de la Leucemia (LIF). Aproximadamente cinco días después los blastocistos se adhieren y las células del embrioblasto crecen formando colonias redondas y compactas las cuales son aisladas y disgregadas con tripsina para posteriormente agregarlas a nuevas células nodrizas. Posteriormente tres o cuatro días después se busca nuevamente el crecimiento de colonias redondas y compactas para la realización y utilización de subcultivos. (14)

Y la tercera forma es la obtención de los embriones en estado de mórula en la cual se realizan lavados del útero con DPBS o con algún medio de cultivo que contenga suero fetal bovino. Con la ayuda de una pipeta las mórulas y sus blastómeras se separan y posteriormente se cultivan sobre células nodrizas que secreten LIF. En el transcurso de cinco a seis días se pueden obtener colonias redondas y compactas que son aisladas y disgregadas adicionando tripsina para posteriormente agregarlas a nuevas células nodrizas y después de transcurrir tres o cuatro días buscar el crecimiento de colonias redondas y compactas para la realización y utilización de subcultivos. (14) Y la cuarta forma, o clasificada dentro de esta tercera, debido a que es de tipo mecánico, es en la cual se realiza una disección con ayuda de unas pinzas o agujas bajo el microscopio estereoscópico. Esta última se ha utilizado para derivar ESC y epiSC en bovinos, cerdos y humanos principalmente.

Cuando en estas células se promueve la diferenciación, forman agregados tridimensionales llamados cuerpos embrioides los cuales corresponden a estructuras tridimensionales muy similares a los embriones en sus primeros estadios de desarrollo y con restos provenientes de las tres hojas blastodérmicas (ectodermo, endodermo, mesodermo) pero sin la organización axial ni la elaboración de un plan de desarrollo corporal, como ocurriría *in vivo*. (1) (14). Para formar un cuerpo embrioide se promueve la diferenciación de las ESC o EpiSC, eliminando ciertos factores del cultivo que son anti-diferenciación, y se someten a

un cultivo en suspensión (que es donde se forman las estructuras tridimensionales).

Para determinar el potencial *in vivo* este tipo de células se inyectan a un animal inmunosuprimido por vía subcutánea o intraperitoneal y se espera la formación de un tipo de tumor benigno conocido como teratoma. (13) (14) (Imagen número 2)

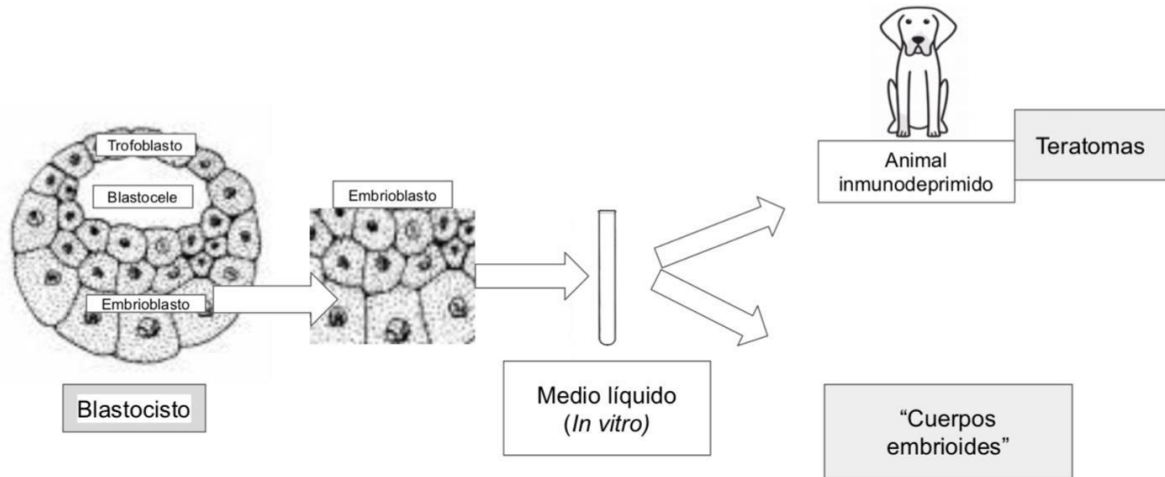


Imagen número 2. Derivación de las células del embrioblasto y formación de teratomas o cuerpos embrioides. (14)

Las células troncales multipotenciales al igual que las anteriores también poseen la capacidad de autorrenovación pero son células que poseen un espectro de diferenciación mayor que las anteriores. (14)

Este tipo de células (multipotenciales) proliferan y darán origen a algún tipo de tejido *in vivo* y una vez desarrolladas se autorrenuevan durante toda la vida del individuo a diferencia de las células troncales totipotenciales y pluripotenciales las cuales solamente se encuentran durante la etapa embrionaria. (14)

Un ejemplo de este tipo de células son las células troncales hematopoyéticas multipotenciales de la médula ósea, las cuales darán origen a células del sistema hematopoyético (eritrocitos, leucocitos y plaquetas). (14)

Existen diferentes tipos de células troncales embrionarias además de las derivadas de la masa celular interna (MCI). Estas son las células troncales de carcinoma embrionario (ECSC), células germinales embrionarias, células amnióticas y células del cordón umbilical. (13)

Las células del carcinoma embrionario (ECSC):

Los teratomas (tumores benignos) o teratocarcinomas (tumores malignos) son tumores de presentación rara en la línea germinal de las gónadas (testículos u ovarios). (13)

El aislamiento de estas células se realizó mediante la recolección de masas tumorales (teratocarcinomas) derivadas de un embrión, las cuales fueron disgregadas e inyectadas en la cavidad abdominal de un animal provocando una “conversión ascítica” mediante la cual se obtuvieron cuerpos embrioides, los cuales se disgregaron con tripsina y fueron inyectados a otro ratón histocompatible con lo cual finalmente se obtuvieron células pluripotenciales llamadas ECSC. (14)

5. Células troncales del adulto (ASC):

Las células troncales no son exclusivas del embrión en desarrollo, también están presentes en el organismo adulto ya que es importante que los órganos puedan poseer un mecanismo mediante el cual pueda existir el reemplazo de células cuando estas mueran ya sea por desgaste, apoptosis o daño y de esta forma mantener una homeostasis en el organismo del individuo. Estas células deben poseer ciertas (capacidades) como resistencia al estrés y adaptabilidad. (14)

Estas células que renuevan y reparan tejidos del adulto deben ser fuertes, capaces de resistir el estrés de eventos que se encuentren asociados con el daño, como los procedimientos quirúrgicos, daños físicos, exposición a tóxicos, daño debido a calor o frío extremos. Las evidencias sugieren que las células troncales que residen en los tejidos del adulto son células que poseen una gran capacidad de adaptabilidad a las variaciones de temperatura, variaciones de pH y exposición a tóxicos. (14)

Para satisfacer correctamente las demandas de células que regeneran los tejidos y órganos del cuerpo existe un proceso de diferenciación bastante complejo regulado con señales de retroalimentación que mantiene una correcta reserva y de esta forma un equilibrio de células troncales precursoras indiferenciadas y de células progenies diferenciadas. De esta forma existe un correcto balance entre señales de proliferación, supervivencia, y diferenciación de células troncales indiferenciadas y diferenciadas durante la vida del individuo. Así, de esta forma una célula troncal puede permanecer en estado inactivo esto como reserva para liberarse y entrar al ciclo celular para ser usadas en momentos de estrés. (14)

Las ASC se pueden encontrar en muchos tejidos especializados del cuerpo como cerebro, médula ósea, hígado, piel, tracto gastrointestinal, retina córnea e inclusive pulpa de la dentina. (14)

Existen diferentes hipótesis sobre el origen de las ASC. La hipótesis más aceptada sugiere que estas células aparecen después de la especificación del linaje y colonizan sus respectivos nichos celulares. (13)

Otra hipótesis sugiere que estas células se escapan del desarrollo embrionario temprano y permanecen en sus respectivos tejidos como células multipotentes o unipotentes y posteriormente colonizan nichos especializados. (13)

La hipótesis que propone que estas células derivan de las células germinales primordiales (PGC), indica que existe una población dentro del organismo adulto de células troncales pluripotentes que circulan por el cuerpo de acuerdo al tejido al que se integran adquieren un fenotipo específico. (13)

Las ASC, también son conocidas como células troncales somáticas y se pueden clasificar de acuerdo a su potencial de desarrollo: (1)

Células troncales multipotentes las cuales poseen la capacidad de generar todos los tipos de células dentro de un linaje particular. Un ejemplo de este tipo de células son las células hematopoyéticas (HSC) las cuales pueden dar origen a todos los tipos de células dentro de ese linaje específicamente. (1)

Células troncales oligopotentes Un ejemplo de este tipo son las células neurales (NSC) las cuales pueden originar neuronas y diversos tipos de células de la neuroglia. (13)

Células troncales bipotentes. Un ejemplo de este tipo serían las células troncales de la glándula mamaria las cuales originan las células epiteliales glandulares y las células mioepiteliales. (13)

Células troncales unipotentes las cuales solamente poseen la capacidad de dar origen a un tipo de células. Un ejemplo son las células madre espermatozonales las cuales solamente pueden diferenciarse espermatozoides. (1)

Las ASC también se pueden agrupar en: 1) Las que darán origen a células propias de cada tejido u órgano (células progenitoras de tejido) y 2) las que son capaces de originar distintos tipos celulares (células troncales multipotenciales) (14)

Las HSC son las células troncales multipotenciales mejor caracterizadas y las más estudiadas esto en el modelo de ratón. Estas células pueden dar origen a cualquier elemento figurado de la sangre (eritrocitos, leucocitos y plaquetas). Tienen un origen mesodérmico y constituyen los linajes celulares de la hematopoyesis. Se localizan en la médula ósea (MO) de los animales adultos y en el tejido hepático durante la vida fetal, su obtención es directamente de MO, sin embargo suele ser un procedimiento muy invasivo y doloroso en humanos, por lo tanto una alternativa para su obtención es provocar su salida del compartimento medular hacia la sangre periférica por medio de una técnica que se conoce como movilización y es inducido por medio de la aplicación de citosinas como filgrastin. (13) (14)

Hace poco tiempo se creía que las células del cerebro después de un daño por isquemia o algún trauma no se renovaban. Sin embargo, actualmente se han identificado NSC en distintas zonas del cerebro. Estas células tienen su origen en la cresta neural y en los mamíferos particularmente se localizan en la región subventricular y en la región subgranular del giro dentado del hipocampo. Los precursores neuronales forman colonias llamadas neuroesferas que se pueden

diferenciar tanto en neuronas como en células de la neuroglia central (astrocitos y oligodendrocitos). (13) (14)

Las células troncales de la piel se encuentran en el estrato basal de la epidermis y en ciertos abultamientos (“bunge”) de los folículos pilosos. (13)

Células troncales de la dentina. Estas células troncales se han podido aislar de la pulpa dental y del ligamento periodontal. (13)

Células troncales mesenquimales. Este tipo de células se ubican en el tejido conjuntivo de una gran cantidad de órganos derivados del mesodermo. Estas células también se pueden obtener de médula ósea de cuyas, los principales sitios de extracción son la cresta ilíaca o la cabeza femoral y en otras especies el esternón. Recientemente el tejido adiposo también proporciona una fuente de dichas células. Otras fuentes de obtención son del líquido amniótico, vasos sanguíneos y el endometrio. (13)

Células troncales musculares. Aunque tanto las células de músculo liso como de músculo estriado esquelético poseen la capacidad de regeneración y multiplicación, se ha observado que las células de músculo estriado poseen una mayor capacidad de realizar estas funciones a este tipo de células se les conoce como células satélite y pueden encontrarse entre el sarcolema y la lámina basal de la fibra muscular. (13) (14)

6. Células troncales pluripotentes inducidas (iPSC)

La pluripotencia se puede definir como la capacidad de una sola célula para diferenciarse en todos los tipos de células somáticas de un organismo adulto. (15)

Las iPSC son células derivadas de células somáticas las cuales se generan a partir de la expresión forzada de cuatro factores (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, y *Myc*) también conocidos como factores Yamanaka. (15)

Se demostró que la morfología celular, la proliferación, los antígenos de superficie, la expresión génica, la actividad de la telomerasa y el estado epigenético de genes

pluripotentes específicos de las células iPSC son similares a las características en las células ESC. (16)

Entre las similitudes entre iPSC y ES se encuentran: la auto-renovación ilimitada, la formación *in vivo* e *in vitro* de las tres capas germinales (16) y la capacidad de diferenciarse en cualquier tipo de célula del cuerpo. Además se considera que ofrecen ciertas ventajas en comparación con las ES. (1)

A diferencia de las células ES las células iPSC pueden generarse a partir de células somáticas propias del paciente, como células grasas, células nerviosas, fibroblastos de la piel, células cutáneas, células del prepucio fetal, células B, células T, monocitos de la sangre periférica, células nucleares, células mesenquimales del cordón umbilical, células mesenquimales coriónicas y células mesenquimatosas amnióticas. (17)

Uno de los pasos importantes es la derivación de iPSC de grado clínico. Este tipo de células se ha derivado comúnmente a partir de fibroblastos dérmicos de biopsias de piel, células T de sangre periférica, células tubulares renales y de queratinocitos aislados del cabello. Estudios anteriores han demostrado que las iPSC retienen cierto grado de memoria epigenética residual de la fuente de células de las cuales fueron derivadas, lo cual podría llevar a cierto grado de sesgo en los resultados. Sin embargo, estudios también demuestran que su memoria epigenética residual se ve disminuida a medida que las células pasan de un cultivo a otro. (18)

6.1 Antecedentes históricos

La reprogramación mediante transferencia nuclear constituye una de las principales líneas de investigación en cuanto a las células troncales. En el año 1962 el investigador John Gurdon realizó un ensayo en el cual reportó el desarrollo de renacuajos a partir de huevos no fertilizados a los cuales se les insertó un núcleo de células intestinales de ranas adultas. (19)

Otro de los descubrimientos importantes fue en el año 1987 donde se identificó un factor de transcripción de *Drosophila*, Antennapedia, w. el cual se demostró que induce la formación de patas en lugar de antenas cuando se expresa ectópicamente. (20)

En el mismo año se demostró que un factor de transcripción en mamíferos MyoD tiene la capacidad de convertir los fibroblastos en miocitos. (21)

En el año 1988 Austin Smith estableció las condiciones de cultivo que permitan el mantenimiento a largo plazo de la pluripotencialidad. (22)

En 1997 el investigador Ian Wilmut y sus colegas informaron sobre el nacimiento de la oveja Dolly, quien fue el primer mamífero generado mediante clonación somática de células epiteliales mamarias. Este éxito demostró que inclusive las células diferenciadas contienen la información genética necesaria para el desarrollo de organismos completos y que los ovocitos poseen los factores para reprogramar los núcleos de las células somáticas. (7)

El aislamiento y caracterización de las ES derivadas de blastocistos de ratón en 1980 por Evans y Kaufman representan un paso importante en la investigación de las células troncales. En ese momento se creía que el aislamiento de estas células ES solamente era posible con cepas de ratón que mantuvieran cierta consanguinidad y que no era posible en especies que no cumplieran con esta característica. (23) Sin embargo, aún al día de hoy no todas las líneas de ratones tienen la capacidad de derivar ESC. Un ejemplo es el ratón silvestre del cual no podemos derivar ESC.

Sin embargo, aproximadamente 15 años después (Thomson et al.) contradujo esta hipótesis al establecer cultivos celulares a partir de primates no humanos monos Rhesus (macaca mulata), titi común y finalmente (ES) de humanos. (24)

Con esto las ESC de primate fueron consideradas células pluripotentes las cuales tenían la capacidad de diferenciarse en los tres tipos de capas germinales y la prueba definitiva en estos ensayos sería la generación de animales quimera, sin

embargo el uso de este tipo de células es controvertido debido a cuestiones éticas y a la falta de disponibilidad de células específicas del paciente. (11)

En consecuencia, se invirtió mucho esfuerzo en la investigación con el objetivo de generar células humanas pluripotentes de otras fuentes distintas de los embriones en preimplantación, que finalmente condujo a la inducción de pluripotencia en células "diferenciadas terminalmente" demostrado por (Shinya Yamanaka). Este estudio en particular fue un gran estímulo para la investigación con células troncales. (10)

Por lo tanto antes del año 2006 se consideraba que las células troncales pluripotentes solo podían derivarse de blastocistos o embriones tempranos antes de la implantación, las cuales se llamarían células ESC si provienen de la MCI, o epiSC si provienen del epiblasto. A pesar de ser una gran promesa para la medicina a estos tipos celulares estaban rodeando demasiadas cuestiones que limitaban su desarrollo.(3) Así que en el año 2006 se realizó un gran avance tecnológico mediante células que presentaban un perfil de expresión génica y un potencial de desarrollo similar al de las células ESC generadas a partir de células somáticas de ratón (fibroblastos) utilizando cuatro factores de transcripción. Los factores de transcripción *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *Myc* (factores de "Yamanaka"). A las células derivadas de este ensayo se les denominó células troncales pluripotentes inducidas (iPSC). (12).

Takahashi y Yamanaka reprogramaron los fibroblastos embrionarios de ratón mediante la expresión de cuatro factores de reprogramación (*Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *Myc*) utilizando vectores retrovirales con lo cual se obtuvieron las células pluripotentes inducidas (iPSC). En el ensayo se utilizaron vectores virales incluidos retrovirus y lentivirus los cuales poseen alta eficacia de reprogramación. Sin embargo con el uso de estos vectores y los factores de reprogramación surgió una cuestión sobre la cual se debe profundizar ya que pueden existir mutaciones en el genoma al integrar otras secuencias de genes, con lo cual aumenta la preocupación sobre el tema de seguridad en la aplicación clínica. Además de que

la inserción de oncogenes como c-Myc aumenta el riesgo de formación de tumores. (15)

En 2007 Takahashi también realizó un estudio pero esta vez en humanos con lo cual la visión y el futuro de este tipo de células cambiaron por completo. (25)

Al observarse estas cuestiones con los factores Yamanaka se procedió a realizar ensayos de obtención de iPSC más seguras utilizando métodos modificados como transposon piggyBac, adenovirus, virus sendai, plásmidos, vectores episómicos y vectores minicírculos, sin embargo se observó que la eficiencia de la reprogramación se reduce significativamente y lleva más tiempo reactivar los marcadores de pluripotencia claves para lograr una reprogramación completa. (15)

En el año 2014 se realizó el primer estudio clínico utilizando las células derivadas de iPSC en el cual se estudió el epitelio del pigmento de la retina humana (RPE) para tratar la degeneración macular. (12)

La Degeneración Macular está relacionada con la edad (DMAE) y es una enfermedad que afecta a la mácula del ojo produciendo desenfoque de la visión central. En el año 2013, con el primer ensayo clínico se trasplantaron láminas de células (RPE) diferenciadas de iPSC. (26)

En esta primera evaluación se utilizaron iPSC derivadas de la piel de un paciente las cuales se diferenciaron en RPE, después de esto se trasplantó en el ojo del mismo paciente del cual se derivaron las células. El paciente en esta evaluación clínica se trataba de una persona de 70 años aproximadamente con DMAE. La cirugía se llevó a cabo con éxito y seis meses después del trasplante el deterioro visual de la paciente cesó y se mantuvo estable sin medicación. (17)

A los 18 meses después de la operación la lámina RPE trasplantada sobrevivió bien y no existió evidencia de rechazo inmune o proliferación exacerbada de células inmunitarias. (17)

Finalmente después de este estudio se intentó en un segundo paciente el trasplante de RPE derivado de iPSC, sin embargo se encontraron mutaciones

genéticas en las células iPSC del paciente lo cual tenía el riesgo de conducir a la formación de tumores por lo cual se suspendió el procedimiento. (17)

También se realizaron estudios clínicos de seguridad para el uso de las células RPE para la degeneración macular seca y distrofia de Stargardt (Schwartz et al. 2012, 2015). (27) (28) Se utilizaron nueve pacientes con degeneración macular y nueve pacientes con enfermedad de Stargardt, en cohortes de dosis de 50,000, 100,000 y 150,000 células administradas en un ojo de cada paciente. Los únicos eventos adversos realmente se asociaron con la cirugía e inmunosupresión. La agudeza visual mejoró en 10 ojos tratados, se mantuvo estable en siete ojos y disminuyó en un ojo durante 22 meses. Se observaron parches de epitelio retiniano regenerado en el 72% de los pacientes, aunque la propagación fue variable e incompleta, lo que sugiere que se podrían realizar mejoras en la metodología para lograr una mayor cobertura de monocapa de RPE de la mácula. Si bien es de esperar que los iPSC se utilicen como terapias autólogas, existe un fuerte movimiento para su uso como trasplantes alogénicos o como parcialmente compatibles. (29)

Otro ensayo por mencionar se realizó en 2016 cuando Cynata Therapeutics lanzó un ensayo clínico con una célula troncal mesenquimal derivada de iPSC alogénica llamada CYP-0015 para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra huésped aguda resistente a esteroides en los cuales los resultados demostraron una seguridad y eficacia positivas. (26)

En 2018 la Universidad de Kyoto anunció un ensayo clínico para tratar la enfermedad de Parkinson en humanos, utilizando trasplantes de neuronas dopaminérgicas derivados de iPSC con el fin de evaluar la seguridad y la eficacia, obteniendo así que las células que fueron injertadas sobrevivieron durante aproximadamente dos años sin ningún efecto adverso. Con esto el propósito del tratamiento sería mejorar los síntomas graves y retrasar la presentación de la etapa avanzada de la enfermedad. Sin embargo también se menciona que las células derivadas de iPSC que serán trasplantadas se pueden ver afectadas por el

entorno patológico del cerebro, obteniendo múltiples variaciones en cada paciente. (26)

6.2 Procedimientos para obtener las iPSC

Hasta la fecha se han identificado al menos seis estrategias para producir células iPSC: retrovirus, lentivirus, adenovirus, transfección de plásmidos, transposon y proteína recombinante (30). En caninos los métodos de reprogramación para la obtención de ciPSCs más utilizados son principalmente mediante retrovirus y lentivirus. (Tabla numero 1)

La utilización de retrovirus constituye el método pionero de obtención iPSc, sin embargo conlleva grandes riesgos de formación de tumores ya que los retrovirus tienen la capacidad de integrar parte de su genoma en el material genético de la célula hospedera. Para evitar lo anterior se desarrollaron otros procedimientos posteriores, empleando otros vectores para la expresión forzada de los cuatro genes o factores de pluripotencia (SMOK).

La utilización de lentivirus también implica la posibilidad de múltiples sitios de integración viral, además del riesgo de la reactivación de algunos genes como c-Myc lo cual puede originar formación de tumores aproximadamente en el 50% de los ratones quiméricos producidos a partir de iPSc. Independientemente, de lo anterior, se sabe que la reactivación de los tres factores de transcripción restantes (SOK) también puede ocasionar tumores, particularmente por la integración viral de los dos oncogenes C-Myc y Klf4. La expresión constante de alguno de los transgenes es muy peligrosa ya que además de interrumpir el proceso de diferenciación de las iPSc incrementa la tendencia a generar teratomas cuando se trasplantan a los pacientes. (31)

Célula de origen	Diferenciación <i>in vitro</i>	Diferenciación <i>in vivo</i>	Método de reprogramación	Referencia
Fibroblastos embrionarios	Diferenciación <i>in vitro</i>	No determinado	Retrovirus	32
Fibroblastos testiculares	Cuerpos embrioides	No formación de teratoma	Lentivirus	33
Células estromales adiposas	Cuerpos embrioides	Teratomas	Lentivirus	34
Fibroblastos dérmicos	No determinado	Tumor de células germinales	Lentivirus	35
Fibroblastos de la piel	Cuerpos embrioides	Teratomas	Retrovirus	36
Fibroblastos embrionarios	Cuerpos embrioides y plaquetas	No determinado	Lentivirus	37

Tabla número 1. Células troncales pluripotentes inducidas caninas (ciPSCs) generadas a partir de células caninas. Utilizando retrovirus y lentivirus como método de reprogramación.

Por lo anterior se desarrollaron otras estrategias para la generación de iPSc sin la integración viral. Un grupo de investigadores generaron iPSc a partir de células hepáticas y fibroblastos utilizando adenovirus para introducir los cuatro factores de transcripción de Yamanaka. Las células resultantes mostraron ser pluripotentes dado que se pudieron obtener animales quimera, teratomas en animales inmunocomprometidos y la diferenciación a diversos tejidos provenientes de las tres hojas blastodémicas (Stadfeldt, 2008).(1)

Okita et al. (2008) desarrollaron un procedimiento en el que emplearon plásmidos con el DNA complementario (cDNA) de SMOK, pero sin el uso de virus como vectores para generar iPSc a partir de fibroblastos embrionarios de ratón, los

autores señalan que muchos de los plásmidos no mostraron integración en el genoma (2).

Debe destacarse que aunque se han logrado producir iPSc utilizando adenovirus o plásmidos su eficiencia es sumamente baja.

Otra estrategia para producir iPSc en ausencia de integración viral es mediante pequeñas moléculas como el ácido valpróico (VPA) que actúa como un inhibidor de la enzima histona desacetilasa, permitiendo la reprogramación de fibroblastos humanos a partir de dos factores OCT4 y SOX2.

Recientemente mediante la enzima transposasa es factible la integración de segmentos de DNA (transposones), que no son de origen viral, incrementando la seguridad, su viabilidad, y diseño más simple del proceso (Kumar et al., 2015) (41).

La utilización de proteínas recombinantes consiste en tratar de introducir directamente a la célula las proteínas de reprogramación, en lugar de esperar que eventualmente los genes transfectados se transcriban y se expresen a través de estas mismas proteínas. Estas proteínas son recombinantes porque se expresan en *E. coli*, agregándoles un dominio de transducción de las cuatro factores de Yamanaka en células de ratón. Una ventaja potencial de esta técnica es la generación de proteínas a gran escala, permitiendo que la aplicación fuera más barata y rápida, pues se ahorra la selección de las células que no expresen los transgenes o que no los expresen de manera completa (Zouh et al., 2009 (5)). Uno de los inconvenientes más importante de esta estrategia es la baja eficiencia de reprogramación.

Existe otra estrategia que consiste en la utilización de constructos de RNA mensajero modificados de los factores de reprogramación (SMOK) en células somáticas humanas generando iPSc humanas. Este método es mucho más eficiente y flexible, pues se lograron eficiencias de derivación de 1.4% comparadas con 0.04 % cuando se emplean retrovirus, lo que implica una eficiencia de más de 36 veces; por lo que puede ser el método preferible de reprogramación (44).

7. Reprogramación nuclear

El término de reprogramación se utiliza para describir los cambios funcionales o moleculares en células que llevan a cabo cambios de linaje o destino celular. Cuando se utiliza en términos funcionales describe los cambios estables inducidos experimentalmente en células que cambian su destino. Sin embargo, en el contexto de la reprogramación de células diferenciadas a células pluripotentes, puede lograrse de varias maneras como son: a) transferencia nuclear de células somáticas, b) fusión de células somáticas con células pluripotentes, c) explantes de células de la línea germinal y d) mediante la expresión forzada de factores de transcripción definidos en células somáticas (38). La reprogramación también se refiere a la conversión de un tipo celular diferenciado en otro por factores de transcripción (39). Como puede ser la transformación de fibroblastos en células musculares, o bien de células acinares del páncreas en células β de los islotes pancreáticos, sin embargo, cuando ocurre este tipo de transformación o conversión se suelen utilizar los términos de “transdiferenciación” o “cambio de linaje”, ya que no conlleva procesos de desdiferenciación de células progenitoras menos diferenciadas, como sucede en la reprogramación de células adultas en células pluripotentes.

Si se utiliza en términos moleculares, describe las modificaciones moleculares durante el cambio de destino, como son la reprogramación epigenética de las células, las regiones promotoras de los genes de pluripotencia sometidos a desmetilación seguida ya sea de transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) o iPSC. La reprogramación epigenética puede ser usada para describir los cambios que ocurren durante el desarrollo, como la metilación del ADN e histonas que ocurren durante la maduración de las células germinales (31).

7.1 Transferencia nuclear de células somáticas (SCNT).

Briggs y King demostraron en 1952 que el núcleo de la blástula de la Rana que se transfiere a un ovocito enucleado, adquiere la capacidad de realizar todo el desarrollo embrionario, lo que sugería que el proceso de diferenciación celular no

era un proceso lineal e irreversible (40)(41) Posteriormente Jhon Gurdon trabajo con otro anfibio (*Xenopus laevis*) tomó el núcleo de células somáticas del intestino de un animal adulto y los colocó en ovocitos enucleados, logrando llevar a cabo la totalidad del desarrollo embrionario obteniendo renacuajos que al crecer originaron ranas fértiles (42), estos experimentos demostraron que a partir de los núcleos de células somáticas diferenciadas (intestinales) insertados en el citoplasma de ovocitos (enucleados), estos núcleos podían ser reprogramados hasta el estado totipotencial y dar origen a un animal adulto.

Posteriormente con el nacimiento de la oveja Dolly a partir del núcleo de células somáticas de glándula mamaria de un animal adulto (43), este último trabajo demostró que es posible revertir completamente el proceso de diferenciación celular en mamíferos, incluyendo el humano. Sin embargo, muchos animales clonados muestran anomalías en la expresión génica y en el fenotipo que van de sutiles o severos, sugiriendo que la SCNT resulta en una falla en la reprogramación epigenética (44).

Los criterios funcionales para poder considerar una célula pluripotente son: Formación de teratomas, formación de animales quimera, formación de cuerpos embrioides, contribución a la línea germinal y complementación tetraploide; a continuación se describen brevemente en qué consisten.

7.2 Formación de teratomas

La inducción de tumores demuestra la potencialidad de generar células diferenciadas de diversos linajes celulares, los teratomas se forman cuando se introducen células pluripotentes debajo de la piel o del peritoneo de ratones inmunodeficientes, produciéndose linajes celulares de las tres hojas blastodérmicas (endodermo, mesodermo y ectodermo). Los teratomas son tumores que contienen células muy heterogéneas como son el pelo, diente, músculo, cartílago, entre otros. Dentro de las limitaciones de este procedimiento no muestra la habilidad de las células para promover un desarrollo embrionario normal (44).

7.3 Formación de animales quimera

Los animales quimera se forman introduciendo células pluripotentes al blastocisto de un ratón hospedero que fenotípicamente es distinto a la cepa donante, generalmente con diferencias en el color del pelaje, debido a su naturaleza pluripotente las células anexas se integran con las del hospedero y contribuyen al desarrollo embrionario normal, es decir tiene la capacidad de poderse diferenciar en cualquier célula del organismo. Estos animales se caracterizan fenotípicamente porque el pelaje presenta parches de colores distintos (propios tanto del hospedero como del donante). Además esta misma característica es válida para todos los órganos del individuo que constan de una mezcla de ambos orígenes celulares.

7.4 Integración tetraploide

La integración tetraploide se considera el procedimiento más estricto para la demostración de células pluripotentes en ratones. Consiste en la formación blastocistos tetraploides mediante la electrofusión de células embrionarias (normales) en el estadio de dos blastómeras, como cada célula es el resultado de la fertilización previa del huevo o cigoto, cada célula tiene un juego completo de cromosomas propios de la especie ($2n$) y al fusionarse la célula resultante tiene dos juegos ($4n$), es decir es una célula tetraploide. Estas células continúan el desarrollo embrionario hasta la etapa de blastocisto (tetraploide); sin embargo, las células $4n$ sólo pueden originar los tejidos extraembrionarios (anexos extraembrionarios de la placenta), pero fallan en el desarrollo del feto, por lo que las células pluripotentes exógenas ($2n$) al introducirse en los blastocistos ($4n$) se integran al desarrollo y son las responsables de la formación completa del feto hasta el nacimiento, de tal manera que todas sus células somáticas están compuestas de manera exclusiva de las células ($2n$) donadas inicialmente (44). La limitación más importante de este ensayo es que no prueba la habilidad de las células donantes de generar el trofoectodermo (placenta), sin embargo esto a su vez confirma que cumple con la definición de células pluripotentes.

7.5 Etapas en la reprogramación para la generación de iPS

El mecanismo de reprogramación por factores definidos SMOK (Sox 2, Oct4, Myc, Klf4) para la generación de células iPS se lleva a cabo a través de cuatro etapas de reprogramación: a) Reversibilidad durante la Etapa I, b) Etapa II: comienzo del cambio irreversible y c) Etapa III: iPS y d) Etapa IV Consolidación de la etapa de reprogramación.

7.5.1 Etapa I: Expresión forzada de los genes

Se lleva a cabo la expresión forzada de los genes exógenos de los factores de reprogramación provenientes de los vectores virales (retrovirus), resulta en la síntesis de las proteínas correspondientes en cantidades elevadas, debido a que se utilizan promotores “fuertes”. Estas proteínas (SMOK) tienen la propiedad de activar los mismos genes correspondientes, pero endógenos, sin embargo para que esto suceda de manera exitosa, se requiere de un periodo de 10-12 días en el que se expresen los genes exógenos para inducir la expresión de los endógenos. La función molecular de los genes exógenos es la activación del circuito de genes, produciéndose las proteínas respectivas y que están destinadas a la autorrenovación y proliferación, pero posteriormente deben apagarse. Los retrovirus tienen la propiedad de silenciarse por factores epigenéticos, por esta razón son adecuados y eficientes para la reprogramación.

Después de esta activación inicial algunas colonias de los cultivos celulares muestran marcadores de superficie propio de células pluripotentes embrionarias (como SSEA-1 en ESC del ratón, SSEA-4 en ESC humanas, TRA1-60 y TRa1-81), en este punto para que las células para puedan continuar en el proceso de reprogramación requieren de factores de crecimiento específicos para ESC, como el factor inhibidor de la leucemia (LIF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) que son de origen humano. Esta etapa se caracteriza porque las células pueden regresar a un estado diferenciado o continuar y expandirse, únicamente el 0.1% del total de las colonias pasan a una etapa irreversible de la reprogramación forman iPS verdaderas (45).

7.5.2 Etapa II: Comienzo del cambio irreversible.

Esta etapa se alcanza cuando los genes introducidos (exógenamente) activan sus contrapartes en el genoma celular y la expresión de ellos son tales que la célula pasa a una etapa irreversible de la reprogramación. Únicamente un número muy reducido de colonias celulares son capaces de pasar a esta etapa irreversible ya que la inmensa mayoría o “regresa” a su estado diferenciado o muere por apoptosis. Para llegar a la etapa II las células deben expresar Nanog en la cantidad suficiente para rebasar un umbral necesario, alcanzar el ciclo celular propio de una célula embrionaria, fortalecer la expresión de todos los miembros del circuito de pluripotencia y perder los marcadores propios de su estado diferenciado (45).

Todas las modificaciones anteriores no se realizan de manera homogénea por todas las células del cultivo, de tal manera que es posible observar diferentes colonias celulares heterogéneas que pueden alcanzar la etapa III para establecimiento de las líneas celulares iPS.

7.5.3 Etapa III: iPS maduras.

Debido a que existían diversas similitudes entre las células reprogramadas y las ESC, durante los primeros años después del artículo original de Yamanaka del 2006 se consideró que esta etapa era la última en el proceso y que la reprogramación del genoma de las células se había concluido. Estas similitudes entre las ESC e iPS fueron: expresión de marcadores de superficie como SSEA-1 en células murinas y de SSEA-4, TRa1-81, Tra-160, TRa2-49 en células humanas; elevada actividad de telomerasa, metilación de histonas en lisina 4 o 9, formación de cuerpos embrioides (con la potencialidad de producir células propias de las tres hojas blastodérmicas), ciclo celular corto (10-12 horas), actividad elevada de fosfatasa alcalina (TNAP), expresión de todo el conjunto de genes de pluripotencialidad y colonias celulares con morfología tridimensional de bordes regulares (45) .

7.5.4 Etapa IV: consolidación de la reprogramación.

Las células resultantes de la etapa III (iPS inmaduras) pueden presentar reprogramación incompleta a pesar de expresar todos los marcadores de pluripotencia y a su capacidad de generar nuevas células diferenciadas, por lo que deben sujetarse a nuevas pruebas a fin de probar son completamente normales y funcionales, una forma de saberlo es conocer si son capaces de integrarse completamente con las células de un organismo. Se han hecho estudios comparativos con base en micro arreglos de DNA (46) (47) y se determinó que existen mayores similitudes entre las propias iPS que entre estas y las ESC, así mismo las iPS que han llevado a cabo un mayor número de pases en cultivo se aproximan más a las ESC en relación con las IPS de pases tempranos. Los genes con un papel más básico dentro del funcionamiento celular (como maduración de ARN, metabolismo o la división mitótica) se expresan a un nivel más bajo en las ipS en relación con las ESC. La conclusión de estos trabajos indica que las iPS inmaduros o tempranos, no han silenciado de manera eficiente diversos genes específicos de linaje (de las células diferenciadas de origen) y por lo tanto no son capaces de inducir genes necesarios para producir un estado completamente indiferenciados (iPS maduras). Las IPS de pases en cultivo avanzados muestran más similitudes con las ESC, lo que señala que las iPS recién producidas deben continuar su reprogramación y reestructuración, pero este mecanismo de “perfeccionamiento” no es el mismo para todas las células sino que dependerá del tipo de célula somática que haya iniciado el proceso, por ejemplo los queratinocitos de la piel están más alejadas en la reprogramación de las ESC que las células provenientes del prepucio humano (45).

Las células somáticas originales conservan una “memoria epigenética” (48) de su origen diferenciado, por lo que estos genes siguen expresándose a pesar del proceso de reprogramación, sin embargo cuando se utiliza el método de transferencia nuclear esta memoria epigenética no se hace presente.

En general las células somáticas más indiferenciadas o que expresen *per se* algunos marcadores de pluripotencia parecen estar más “dispuestas” a la

reprogramación, la implicación de esto es que para cada tipo celular pueden utilizarse una combinación de factores más eficaz y en ciertos casos evitar la utilización de marcadores de pluripotencia que ya expresan, así las células del organismo pueden clasificarse de acuerdo a su grado de plasticidad de acuerdo a su grado de diferenciación y por ende a su capacidad de desdiferenciación (45)

8. Mecanismos epigenéticos en la formación de iPS

Conrad H. Waddington en 1942 utilizó inicialmente el término de “epigenética” para tratar de explicar cómo el medio ambiente puede influir en la expresión génica e interactuar de alguna manera con el genoma (44). Waddington desarrolló el concepto de “paisaje epigenético” que se representa a través de valles y crestas y que indican en la parte superior (crestas) la ubicación de células indiferenciadas y conforme se desciende a los valles las células se van diferenciando en diversos linajes celulares. El paisaje epigenético permite explicar visualmente los procesos de diferenciación, transdiferenciación y reprogramación.

La epigenética se refiere a cualquier cambio reversible y heredable del material genético (genoma) que influye en la expresión génica, pero sin alterar la secuencia de bases o nucleótidos del ADN, es decir la información genética como tal.

Como ya se ha mencionado los cambios epigenéticos son reversibles, y esta es la base de la reprogramación nuclear, pues las células no modifican información genética con el proceso de diferenciación celular, sino únicamente hacen arreglos epigenéticos, que hacen del proceso maleable. Los cambios epigenéticos se encuentran directamente relacionados con la formación de iPSCs, estos cambios incluyen fundamentalmente: metilación del ADN, modificaciones covalentes de las histonas como son metilaciones y acetilaciones y la participación de miRNA y siRNA, dos variantes de RNA de interferencia (iRNA).

Las diferentes etapas de la reprogramación dependen de la expresión génica características de cada fase y los cambios epigenéticos correspondientes.

Los cambios epigenéticos que ocurren durante el proceso de reprogramación se han dividido en siete etapas: a) Reactivación de genes endógenos relacionados con la pluripotencia, como es el caso de Oct 4, Sox 2 y Nanog b) Metilación de histonas específicas como son H3K27 y H3 K4 (estos símbolos se refieren a la trimetilación de la histona H3 en el aminoácido lisina 27 o 4 respectivamente), c) Hipometilación de la cromatina, d) Reactivación del cromosoma “X” inactivo (en las hembras, ya que en los machos siempre se expresa el único cromosoma “X” con el que cuentan las células), e) Mantenimiento de las marcas de metilación del DNA, f) El silenciamiento retroviral utilizado en la inducción de la pluripotencia, y finalmente g) Cambios bidimensionales y tridimensionales de la cromatina y la ubicación de subdominios nucleares (49) (50).

Los principales cambios epigenéticos en el proceso de reprogramación de células somáticas a iPSCs son las siguientes: 1) Metilación del ADN, 2) Modificación covalente de las histonas en la reprogramación de iPSCs 3) Participación de los miRNA en la reprogramación de iPSCs.

8.1 Metilación del ADN

La metilación del DNA tiene lugar caso de manera exclusiva sobre las bases de citosina adyacentes a una guanina, esta combinación se denomina dinucleótido CpG, si se agrupan muchos dinucleótidos se forman las llamadas islas de CpG, que se ubican cerca de las secuencias promotoras adyacentes a los genes. Los genes con islas CpG son transcripcionalmente silenciosos, porque estas metilaciones ocupan el surco mayor de la molécula de ADN, adquiriendo una forma más compacta y dificultan el acceso de los factores y la maquinaria de transcripción (51).

Las islas CpG de los genes constitutivos necesarios para la “economía doméstica” de la célula (actividades esenciales y cotidianas de la célula) así como los genes específicos no son metilados por lo que se transcriben sin dificultad.

En la heterocromatina (regiones condensadas de la cromatina que son metabólicamente inactivas) se encuentran la mayor parte de las islas CpG

metiladas se encuentran en secuencias de ADN repetitivos, como son los centrómeros y telómeros. También se encuentran silenciados por metilación del ADN los transposones (o elementos transponibles) como son el LINE y SINE que corresponden a regiones que abarcan un importante porcentaje del genoma humano. También uno de los dos cromosomas X de las hembras se inactivan formando parte también de la heterocromatina (51).

La metilación del ADN es considerada una barrera epigenética en la reprogramación de las iPSC, ya que se dificulta la expresión de genes de pluripotencia como son Oct4 y Nanog, por lo que se requiere de la desmetilación de las regiones promotoras de estos genes. Inhibidores de la metiltransferasa 1 como la 5-azacitidina y el ADN hidroxilasa pueden ayudar a este proceso, mejorando la reprogramación. El ácido ascórbico (vitamina “C”) actúa como un cofactor, estimulando la hipometilación, lo que ocasiona un incremento en la actividad de la enzima Histona H3K36 desmetilasa, mejorando igualmente la eficiencia de la reprogramación (50).

8.2 Modificación covalente de las histonas

Los aminoácidos del extremo amino terminal de las histonas de los octámeros que constituyen a los nucleosomas (H2A, H2B, H3 y H4) pueden modificarse covalentemente de varias formas: acetilación, metilación y fosforilación. Los aminoácidos que se modifican sobresalen del nucleosoma y son muy conservados. Estas alteraciones covalentes modifican la estructura de la cromatina facilitando o impidiendo el acceso de la maquinaria de transcripción. La acetilación es catalizada por la enzima Histona acetil transferasa (HAT) y da como resultado una cromatina “abierta” que facilita el acceso de la maquinaria de transcripción. Sin embargo la acetilación es reversible (por la enzima Histona desacetilasa HDAC) modificando la cromatina en el sentido opuesto a “cerrada” haciendo inaccesible el ingreso de la maquinaria (51).

Durante la reprogramación, de manera específica la acetilación de los residuos de lisina 4 y 27 de la histona H3 (H3K27 y H3 K4 respectivamente) da lugar a la activación de la transcripción.

Por otro lado, de manera inversa la metilación de H3K27 se asocia al silenciamiento de diversos genes, pues la trimetilación de la lisina 27 de H3 bloquea la reprogramación al reprimir la expresión génica de la región de la cromatina donde se ubican genes característicos de las células troncales. Las modificaciones covalentes de las histonas son procesos complejos, ya que la metilación de la lisina 4 de H3 está asociada con la activación de diversos genes embrionarios (49).

El uso de moléculas pequeñas con fines de reprogramación tiene la ventaja de que no son compuestos inmunógenos, de fácil producción y mayor rendimiento. Estos compuestos como la vitamina "C", la forskolina y el ac. Valpróico (un inhibidor de la enzima histona desacetilasa -HDAC-) pueden aumentar la eficiencia de reprogramación de las iPSCs, al desmetilar el ADN en la región del promotor de los genes claves y modificar regiones específicas en las histonas (50).

8.3 Participación de los miRNA en la reprogramación de iPSCs.

Los micro RNA o miRNA son una variedad de moléculas de RNA de interferencia (iRNA) que controlan la expresión génica en iPSCs de manera postranscripcional, al impulsar la pluripotencia al modular la estabilización del mRNA, así como la cascada de señalización propias de la pluripotencia y reprimir la diferenciación celular durante la autorrenovación celular de células troncales embrionarias (ESC) (50).

Hay diversos miRNAs que favorecen la reprogramación de las iPSCs: a) algunos miRNAs (miR 290-295) favorecen de manera indirecta la transición de genes asociados con la entrada de G₁ a S del ciclo celular con lo cual se incrementa casi

10 veces el porcentaje de eficiencia de la reprogramación (de 0.01-0.055 a 0.1-0.3%) (52), b) otros miRNAs (miR 302-367 y miR 371-373) suprimen la expresión de la proteína MBD2 que actúa similar a una desmetilasa en las células, lo que se traduce en un incremento en la expresión de un gen de pluripotencia Nanog y la conversión de iPSCs totalmente reprogramadas, también estos miRNAs son capaces de reducir la expresión de inhibidores de la transición G1-S e incrementar la cinética de la transición mesénquima-epitelio (MET) que se requiere para la reprogramación (53); c) Durante la reprogramación inicial los miR 200b , miR205 promueven la transición MET a través de la señalización del factor de crecimiento transformante β (TGF- β), que en combinación con los SMOK (factores de Yamanaka) hacen innecesaria la participación de la proteína morfo génica ósea (BMP) (54); d) de manera contraria los miR93 y 106 suprimen la expresión de TGF- β y la proteína p21 incrementando la proliferación celular y conduciendo a la célula a MET (55); finalmente e) en la expresión de genes de la matriz extracelular a través de la regulación de TGF- β , proteína 5 de unión al factor de crecimiento similar a la insulina (IGFBP5) y proteína 1 de la ruta de señal inducible (Wisp1) se expresa de manera muy elevada el miR-135b (56).

Existen miRNAs que actúan impidiendo la reprogramación, como son el MiR Let-7 inhibe la expresión de diversos factores de pluripotencia como son Sox-2, Nanog Oct 4 y Tcf3 estabilizando el estado de diferenciación celular porque inhibe la transición de G₁-S del ciclo celular y la traducción de CDK4 (ciclina dependiente de cinasa 4), además de formar un circuito de retroalimentación negativa, proporcionando un mecanismo molecular que facilita la decisión entre la diferenciación celular y la autorrenovación (57). Dos MiR-34a, miR34b/c inhibe la expresión de tres factores de pluripotencia: Sox2, Nanog y c-Myc, porque estos micro RNAs se dirigen al gen supresor de tumores p53, evitando con ellos la reprogramación de las células somáticas al estado pluripotente (58).

9. Perspectivas de utilización de iPSC en medicina veterinaria

9.1 Modelos animales para diversas enfermedades

El modelado de enfermedades basado en iPSCc está indicado generalmente para tratar trastornos causados por una sola mutación genética (trastornos monogenéticos) y que tienen inicio temprano ya que de esta forma las iPSC pueden derivarse más fácilmente de los pacientes y diferenciarse en células relevantes para dicha enfermedad (12) (Tabla número 2)

Modelo de enfermedad	Células madre pluripotentes inducidas (iPSC) derivadas de células caninas	Efecto o propósito	Referencia
Cardíaca. Infarto al miocardio e isquemia de extremidades posteriores	Células estromales adiposas caninas y fibroblastos caninos	Trasplante autólogo	34
Osteoartritis en perros	Fibroblastos dérmicos	Eficacia y seguridad para el tratamiento de enfermedades articulares humanas	56
Trombocitopenia	Fibroblastos embrionarios caninos	Terapia para la TTP canina y una promesa extensible para la TTP humana	37

Tabla número 2. Estudios que utilizan células troncales pluripotentes inducidas (iPSC) con enfoques terapéuticos. (32)

Las aplicaciones de las células iPSC principalmente se enfocan a enfermedades en las que su curso es crónico y no agudo como son padecimientos localizados en ojo, páncreas, hígado y diversos trastornos o lesiones degenerativas neurales como la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) y la lesión de la médula espinal son las principales causas para utilizar candidatos para la terapia celular basada en iPSC. (29)

9.2 Investigación de fármacos

Dado que cualquier célula clínicamente relevante como los cardiomiocitos, células neuronales, hepatocitos, células beta pancreáticas secretoras de insulina, y células progenitoras renales pueden derivarse de iPSC específicas del paciente sano o de pacientes enfermos podrían servir como modelos más confiables para el descubrimiento de medicamentos, realizando así un análisis de células enfermas versus células sanas aportando conocimientos sobre el funcionamiento de algunos tipos de fármacos. (18)

Un importante inconveniente en el desarrollo de fármacos son las posibles alteraciones cromosómicas por el alto número de pasajes y cultivos prolongados en estas células puede alterar la representación de una célula normal con un comportamiento fisiológicamente *in vivo* lo cual nos llevaría a resultados poco confiables. (18)

9.3 Terapia celular para diversas enfermedades.

El hígado es un órgano objetivo ideal para la terapia basada en células, pensando en el trasplante de hepatocitos en pacientes con hepatopatía metabólica hereditaria o insuficiencia hepática aguda, ya existen pacientes en que los hepatocitos trasplantados son capaces de repoblar el hígado y restaurar la función hepática hasta 18 meses. Sin embargo, aquí debemos considerar que los hepatocitos derivados de órganos de donantes sólo pueden proporcionarse a una pequeña cantidad de pacientes de los muchos que lo necesitan, descartando así situaciones de urgencia. (11)

Otro ejemplo es la ingeniería del músculo cardíaco bioartificial la cual puede reemplazar tejido cardíaco infartado, sin embargo, esta ingeniería se ve obstaculizada por el hecho de que los cardiomiocitos adultos (CM) tienen un bajo potencial de proliferación. (11). También se ha observado que los cardiomiocitos trasplantados no logran integrarse fisiológicamente a los impulsos nerviosos

generados por el órgano y forman grupos con impulsos ectópicos que pueden representar un peligro potencial de disfunción cardíaca e incluso paro cardíaco (59)

El modelado de enfermedades, con mayor frecuencia en roedores puede llevar a la desventaja de extrapolar estos ensayos de animales a humanos para obtener resultados confiables, debido a la diferencia entre especies y a la variación en las respuestas biológicas, lo cual podría verse reflejado en un fracaso en la introducción y comercialización de nuevos fármacos. (18)

Para el modelado de enfermedades lo ideal sería realizar ensayos utilizando animales con mayores similitudes con el hombre y posteriormente ser probados en humanos, sin embargo todo esto se ve limitado debido a que las fuentes celulares son insuficientes y de difícil acceso como por ejemplo cardiomiocitos, células neuronales, células beta pancreáticas y otro tipo de células clínicamente relevantes. (18)

10. iPSC en pequeñas especies

10.1 Obtención de iPSC en perros y gatos

En este estudio se describe la primera generación de iPSC del gato doméstico. Este trabajo proporciona los pasos iniciales para realizar avances en pacientes felinos y mejorar el potencial de los gatos como modelos animales para enfermedades humanas análogas donde las terapias prospectivas pueden traducirse rápidamente de la clínica felina a la humana. Este ensayo informa la generación de iPSC a partir de gatos domésticos (fiPSC). Donde los fibroblastos se derivaron de tejido adiposo de felinos los cuales se infectaron con retrovirus anfotrópico que contenía las secuencias de codificación para Oct4 humano, Sox2, Klf4, cMyc y Nanog. Los clones de iPSC aislados se expandieron en fibroblastos embrionarios inactivados de ratón en presencia de factor inhibidor de leucemia felina (LIF). El suministro retroviral de genes pluripotentes humanos dio lugar a colonias de fiPSC dentro de 5-7 días. Estas células similares a iPSC requirieron

suero fetal bovino y LIF felino para su mantenimiento. Estas colonias tenían cúpulas con bordes retráctiles similares a las iPSC de ratón. La inmunocitoquímica demostró tinción positiva para marcadores de células troncales fosfatasa alcalina, Oct4, Sox2, Nanog y SSEA1. Estas células fueron negativas para SSEA4. La expresión de Nanog felino endógeno se confirmó por PCR. Posteriormente las células pudieron diferenciarse in vitro en células representativas de las tres capas germinales. Finalmente estos resultados confirman la generación de las primeras células pluripotentes inducidas a partir de gatos domésticos. (30)

10.2 Perspectivas de aplicación en medicina veterinaria de pequeñas especies.

En medicina veterinaria los animales de compañía desarrollan naturalmente muchas enfermedades que se parecen a las condiciones que padecen los humanos por lo tanto representan una fuente de gran importancia en la investigación como modelos preclínicos. (62)

Las enfermedades de los animales de compañía reflejan muchas condiciones humanas con respecto a sus síntomas, historia natural, patología, asociaciones genéticas, fenotipo molecular, factores de riesgo ambientales y respuesta a la medicación. (30) Por lo tanto la homología de secuencias genéticas de tejidos sanos es más extensa entre humanos y animales de compañía que entre humanos y roedores, lo que sugiere que los datos de las investigaciones con animales de compañía tienen un potencial más significativo para descubrir y comprender de mejor forma la patogénesis de las enfermedades y los mecanismos de resistencia a los tratamientos, probando de igual forma los beneficios que pudiera traer las distintas terapias usando como base los modelos animales para la aplicación de las células troncales en humanos (62) (Imagen 3).

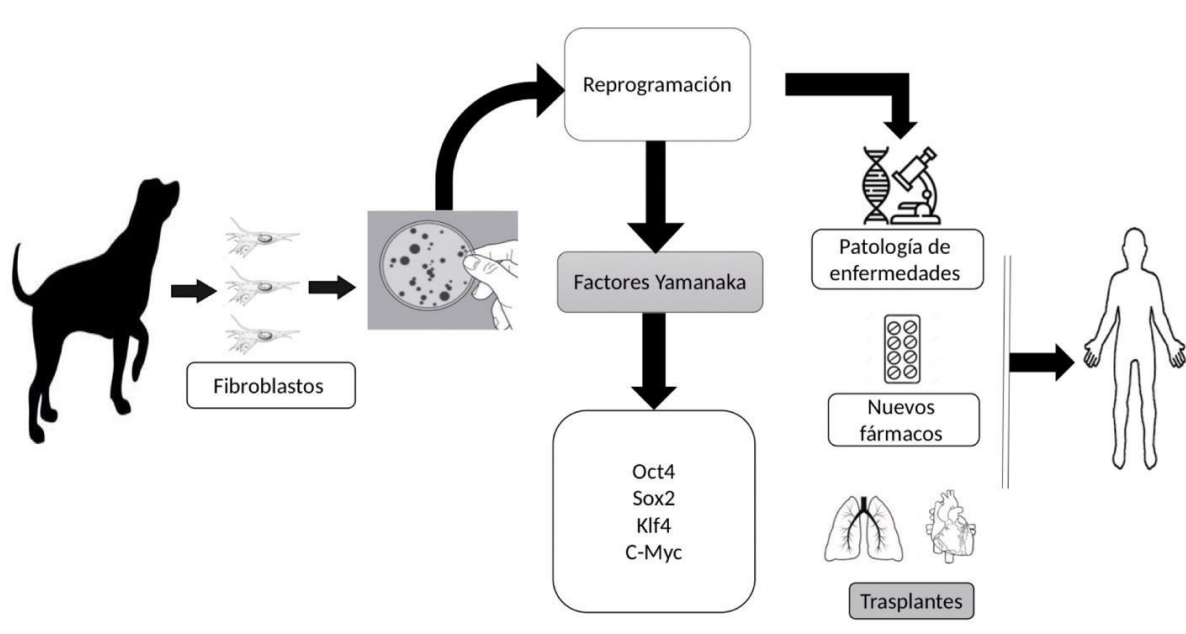


Figura 3. Obtención de células iPSC en medicina veterinaria para el beneficio humano. (14)

Un objetivo con las células iPSC es emplearlas para probar la toxicidad de medicamentos *in vitro* creando modelos de enfermedades. Un ejemplo son las células hepáticas (hepatocitos) generadas a partir de iPSC de individuos con diferentes componentes enzimáticos del citocromo p450 las cuales podrían predecir la toxicidad hepática de nuevos fármacos. (63)

Otra posibilidad es desarrollar mediante ingeniería tisular líneas celulares “universales” las cuales serán modificadas genéticamente y se tratará de obtener un desarrollo con cierto margen de tolerancia, con lo cual podrían obtenerse mediante protocolos de inducción iPSC clínicamente aplicables. (11)

La terapia celular alogénica convencional requiere de producir inmunosupresión previa, con la preocupación de que con esto aumenta el riesgo de insuficiencia renal, infecciones graves o la presencia de tumores. Esto nos encamina a generar una línea universal de iPSC con tolerancia inmune. Ensayos novedosos han informado recientemente la inactivación del complejo de histocompatibilidad

(MHC) clase I y la sobre expresión de los genes de CD47 en iPSC con lo cual se logró evadir el rechazo inmune y que sobreviviera sin el uso de inmunosupresores. Estos enfoques tendrían el potencial de abrir nuevos caminos a terapias celulares derivadas de iPSC sin preocupaciones y complicaciones de rechazo inmune. (18)

Una perspectiva de aplicación es derivar células de pacientes con enfermedades genéticas, lo cual permite que se desarrollen líneas de iPSC específicas del paciente para desarrollar pruebas de drogas in vitro. Un ejemplo son las líneas de iPSC que albergan mutaciones que se sabe que causan miocardiopatía hipertrófica (HCM) en el gato ya que recapitulan eficazmente la enfermedad a nivel de células individuales, lo que podría permitir el descubrimiento de nuevos objetivos farmacológicos para la terapia clínica. (30)

La presencia de la cardiomiopatía dilatada hipertrófica en gatos domésticos (HCM) se parece mucho a la (HCM) humana a nivel genético clínico y patológico. En cuanto a la población felina afecta alrededor del 15% de todos los gatos y aumenta casi al 30% en animales mayores de nueve años. Dada la importancia y las similitudes de la enfermedad tanto en humanos como en gatos se pueden descubrir y desarrollar nuevas terapias farmacológicas beneficiosas sería beneficioso para la salud de ambas especies, aportando nuevos descubrimientos tanto para la medicina humana como para la medicina veterinaria. (64)

10.3 Ventajas de la utilización de iPSC en medicina veterinaria regenerativa

A diferencia de los animales de experimentación como los roedores, los perros y los gatos son animales que tienen un tiempo de vida mayor, además de que generalmente se desarrollan en un entorno diferente al confinamiento del laboratorio, lo cual los mantiene expuestos a factores externos y ambientales. Derivado de lo anterior, presentan con frecuencia enfermedades como obesidad, diabetes y cáncer, además del deterioro propio del envejecimiento y que los hacen susceptibles a lesiones traumáticas como las que sufre algún paciente humano.

(18) Estas condiciones en la investigación con este tipo de pacientes puede dar una oportunidad significativa para usarlos como modelos de enfermedades frecuentes a los animales de compañía con enfermedades específicas de humanos para ensayos clínicos en humanos tomando en cuenta algunos criterios de exclusión como la edad, el peso corporal, la condición corporal, comorbilidades, etapa de la enfermedad o terapias previas y disposición de los propietarios para que participen en los estudios. (62).

La producción e investigación de iPSC en medicina veterinaria tiene la ventaja que la regulación legal y ética es menos estricta que en medicina humana lo cual podría facilitar su desarrollo y aplicación clínica. (65) Por lo tanto este tipo de ensayos podrían desarrollarse y proporcionar información a niveles comparables con los estudios en humanos. (62)

Estos enfoques podrían incluir la evaluación de SC genéticamente mejoradas, o SC específicas de linaje, En los últimos años se han podido desarrollar organoides, que son constructos tridimensionales compuestos de diferentes tipos celulares que se originan mayormente de SC y en particular de iPSC, que tiene la extraordinaria capacidad de organizarse y diferenciarse por sí mismas siendo capaces de simular la estructura y funcionalidad de los órganos originales; también se tratan de utilizar exosomas, que son vesículas extracelulares que al ser aplicadas en el paciente cumplen funciones de comunicación intercelular pues contienen citosinas y RNA mensajeros y RNAs de interferencia pequeños (si RNAs) que modifican el comportamiento y la diferenciación de células dentro del organismo del mismo modo que lo harían las cSC, particularmente las MSCs, favoreciendo los procesos de regeneración tisular ,pero sin los inconvenientes y los riesgos de la aplicación de células SC o iPSC (citas). Todos estos procedimientos están encaminados en hacer realidad en un futuro no lejano la medicina regenerativa personalizada.(39)

Otra de las principales ventajas de las iPSC es que son células inmunológicamente compatibles, (Nishikawa et al., 2008). (43) En las aplicaciones clínicas el rechazo inmunológico es uno de los principales problemas al realizar un

trasplante de algún órgano o tejido. La promesa que presentan estas células en un futuro sería obtener células iPSC derivadas del propio paciente para de esta forma poder realizar el trasplante y así evitar el rechazo inmunológico lo cual nos acerca a una medicina personalizada. (25)

Por lo tanto se consideran mucho más útiles en una aplicación médica ya que estas células al ser generadas a partir de células del propio paciente teóricamente estaríamos así evitando el rechazo inmunológico. (17)

Una ventaja que poseen las células iPSC humanas en comparación con las ESC es que estas pueden generarse a partir de prácticamente cualquier tipo de células somáticas o adultas, sin destruir el blastocisto humano. Las iPSC pueden ser generadas a partir de células somáticas provenientes de pacientes normales y de esta forma utilizarse como como una herramienta celular para investigar mecanismos del desarrollo en humanos y el modelaje de enfermedades de una manera que antes no era posible. (26)

Al ser generadas a partir de pacientes que presentan enfermedades genéticas, como la enfermedad de Alzheimer, se pueden desarrollar modelos de enfermedad *in vitro* ya que los métodos de reprogramación han mejorado significativamente con nuevos vectores, o con el uso de proteínas recombinantes produciendo células iPSC del paciente portadoras de mutaciones específicas lo cual nos podría acercar a comprender mejor la patología de la enfermedad. (25)

La reprogramación *in vitro* de las células somáticas mediante los factores de Yamanaka y la generación de iPSC abrió la posibilidad de considerar la reprogramación de las células somáticas del organismo, es decir realizar una reprogramación *in vivo* con la finalidad de poder rejuvenecer al organismo (Taguchi et al., 2017; Goya, et al., 2018; Galkin et al., 2019). (67) (68) (69)

Se considera que la exposición a corto plazo a los factores de reprogramación parcial de las células puede modificar sus características fisiológicas y celulares en cuanto al envejecimiento esto debido a una probable remodelación de los marcajes epigenéticos durante el envejecimiento. (26).

Con esto los marcadores de reprogramación parcial se puedan obtener células rejuvenecidas con un potencial de realizar las funciones completas y con un riesgo menor de oncogénesis. Estos enfoques de reprogramación parcial y el consiguiente rejuvenecimiento pueden servir para desarrollar futuras posibilidades para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la edad, la mejora de la salud y la longevidad. (26)

Recientemente se estudió el potencial de las células pluripotentes inducidas para la inmunoterapia, con el interés en particular en tratamientos de cáncer. Esto utilizando iPSC y derivando células dendríticas y macrófagos las cuales son células que poseen la capacidad de activar las células T mediante la presentación de antígenos pudiéndose utilizar en inmunoterapia contra el cáncer. Estos enfoques podrían servir para desarrollar tratamientos contra tumores malignos (26)

10.4 Desventajas y retos en la utilización de iPSC en medicina veterinaria regenerativa.

El potencial de las iPSC es enorme, pero quedan muchos obstáculos antes de que sus aplicaciones médicas y farmacéuticas puedan realizarse plenamente. (63)

Algunas de las limitantes actuales que se deben mencionar son la falta de tecnologías de cultivo a gran escala de las iPSC, además de la ineficiente diferenciación de estas células con la cual no se logra que sea completamente específica por lo tanto se deben evaluar los riesgos relacionados con la formación de teratomas después del realizar trasplantes . A pesar de esto se considera que la formación de teratomas puede ser manejable a través de rigurosos métodos de purificación celular y con los sistemas genéticos que permiten la ablación de injertos de células contaminantes. (11)

Otra desventaja de las iPSC es la presentación de anomalías cromosómicas la cual podría surgir durante la expansión secundaria al trasplante y la cual puede

dar origen a una transformación maligna. (11). Esto se debe a que se ha observado que las iPSC presentan inestabilidad genética.

Uno de los desafíos más importante para poder trasladar las iPSC a su aplicación clínica requiere vencer varios obstáculos como son: la ineficiencia y la reprogramación incompleta de estas células, además de las mutaciones que ocurren durante el proceso de la reprogramación y durante el cultivo. (26)

Otro problema con la utilización de iPSC en la clínica es que ciertas enfermedades requieren del empleo de más de un tipo celular para poder tratarlas, como es el caso de la esclerosis lateral amiotrófica que además de motoneuronas se requieren células de la glía que deben desarrollarse a partir de las iPSC del mismo paciente (Yamanaka 2009). (63)

El uso de transgenes oncogénicos como Myc para lograr la reprogramación aumenta el riesgo de mutagénesis por inserción, debido al uso de retrovirus para la inducción de la pluripotencia. Por lo cual se deben manejar tecnologías alternativas para lograr la generación de células iPSC libres de transgenes. (11)

La utilización de retrovirus y lentivirus en la reprogramación nuclear para generar iPSC representa un riesgo para su aplicación clínica, no solo por la mutagénesis, como ya se ha mencionado,

Además el uso de los retrovirus pueden hacer que el PSC sea inmunogenico (Zhao et al. 2011). (15) Así que se han informado distintas formas de generar IPSC sin integración las cuales incluyen; plásmido (Okita et. Al 2011; Okita et al. 2008) (70) Virus sendai (Fusaki et al 2009) (71) adenovirus (Stadtfield et al. 2008) RNAS sintetizado (Warren et al. 2010) y proteínas (Kim et al 2009). (48)

El riesgo de cáncer aumenta significativamente con la edad de los mamíferos, por lo que la edad de los animales que se utilizan como fuente de iPSC es determinante para poderlas utilizar en la clínica. Como consecuencia se debe considerar el uso de fuentes de células jóvenes como por ejemplo las células

derivadas de la sangre del cordón umbilical lo cual nos podría asegurar mayor utilidad clínica. (11)

Una preocupación importante para el uso de las células iPSC en cuanto a su aplicación en pacientes es el riesgo de tumorigenicidad esto debido a que las células se mantienen en cultivo por períodos prolongados lo cual puede acumular anomalías cariotípicas y perder la heterocigosidad por lo tanto se debe mantener una alta seguridad antes de llegar a una aplicación clínica con este tipo de células. (12)

Otro punto crítico que debe garantizarse con las iPSC es su funcionalidad, debido a que cada paso en su reproducción celular es complejo y presenta complicaciones como son: las condiciones de diferenciación, selección *in vitro*, tasa de supervivencia inicial, tasa de supervivencia en el injerto y comunicación con el nicho. (25)

El proceso de desarrollo de las células iPSC a partir de células somáticas, es un proceso de larga duración lo cual limita su aplicación en enfermedades agudas y lesiones como la hemorragia cerebral aguda, traumatismos, insuficiencia cardíaca aguda, shock anafiláctico, hemorragia gastrointestinal, gastroenteritis aguda y dificultad respiratoria aguda (17)

Otro inconveniente en la utilización de iPSC diferenciadas en terapia celular, puede ser que el injerto sea muy invasivo como en el caso de los cardiomiocitos, además del riesgo de la falta de integración fisiológica del injerto generando arritmias cardíacas como ya se ha mencionado, o el riesgo potencial de generar tejido ectópico (Lai, et al. 2011), (72) además de otras complicaciones como osificaciones y calcificaciones del tejido hospedero. (Breitbach, et al., 2003). (67)

Para tratar de evitar la invasividad en el proceso del injerto, las células pueden aplicarse por vía sanguínea, buscando que ocurra en “homing” que consiste en la integración y arribo de las SC trasplantadas al sitio lesionado, existiendo una correlación directa entre el número de células que llegan al tejido con el grado de lesión tisular, este fenómeno ha sido descrito (Chapel, et al., 2003). (73) La

aplicación intravenosa de SC no está exenta tampoco de complicaciones ocasionando por un lado la obstrucción de vasos pequeños distales al sitio de aplicación (Furlani, et al., 2009) (74), o por el otro la ineficiencia en el ingreso de las células trasplantadas en ciertos órganos como son: los pulmones, los riñones y el bazo (Kidd, et al. 2009). (75)

En teoría las células iPSC y sus derivados no tendrían por qué generar una respuesta inmunológica por ser trasplantes autólogos o isogénicos, que provienen del mismo paciente, sin embargo algunos estudios han demostrado que las células iPSC pueden mostrar características genéticas y epigenéticas anómalas, por su inestabilidad genómica y por lo tanto pueden provocar un rechazo inmunitario. (17)

Se ha observado que las células iPSC de pasaje temprano de las células de Sertoli forman teratomas con menos daño tisular, menos infiltración de células inmunitarias y menos necrosis in vivo en comparación con las células iPSC de pasaje tardío en ratones singénicos, lo cual sugiere que las células iPSC pueden perder la baja inmunogenicidad tras sistemas de pases prolongados in vitro. (17)

Uno de los retos que debe superarse en el empleo de las iPSC es mejorar su eficiencia, cuando Yamanaka y Takahashi generó las primeras células iPSC a partir de fibroblastos embrionarios de ratón, la eficiencia informada fue de 0.1%. Al siguiente año utilizaron la misma técnica para la obtención de células iPSC humanas y la eficiencia disminuyó a 0.01%. Posteriormente para reducir el potencial de generación de oncogenes de c-Myc este grupo de investigadores eliminó uno de los genes utilizando solamente (Oct4, Sox2 y Klf4) para generar iPSC en el ratón y el humano pero la eficiencia disminuyó aún más a 0.001% y 0.01% respectivamente. (16)

Una estrategia alternativa probada por Huangfu et al. 2008 usando Oct4, Sox2 y ácido valpróico (VPA), un inhibidor de histona desacetilasa que admite la reprogramación primaria de fibroblastos humanos con sólo dos factores para generar células iPSC humanas. Estos resultados respaldan la posibilidad de

realizar la reprogramación a través de solo dos medios químicos, con lo cual se podría aumentar la seguridad celular y el potencial para su uso terapéutico, sin embargo, esta estrategia tiene el riesgo de que los virus se integren en los cromosomas y alteren las secuencias endógenas del genoma. (16)

En cuanto a las investigaciones con animales existen algunos modelos de enfermedades que podrían llegar a un diagnóstico fácilmente, sin embargo existen también algunas condiciones en las que puede ser difícil llegar a un diagnóstico definitivo en el cual se necesitaría la confirmación mediante una imagen específica como resonancia magnética, tomografía computarizada, tomografía por emisión de positrones lo cual puede no ser accesible para los propietarios. (62)

Para superar estas limitaciones algunos investigadores intentan establecer colonias reproductoras de animales de compañía, con el fin de reproducir la enfermedad sin embargo estos ensayos aún tienen mucho camino por recorrer. (62)

También se ha visto una variabilidad en la inactivación del cromosoma X, observando que algunas iPSC humanas mantuvieron la inactivación del cromosoma X durante el proceso de reprogramación mientras que otras células mostraron ambos cromosomas X reactivados o con una reactivación anormal o parcial. (26)

La estabilidad de la reactivación e inactivación del cromosoma X puede dar como resultado una población que no presente un estado constante de activación de este cromosoma lo cual es de interés si se quisiera utilizar células iPSC para modelar el desarrollo embrionario temprano y enfermedades ligadas al cromosoma X y trastornos ligados al sexo como podría ser el autismo. (26)

La tecnología iPSC permite la reprogramación de células de individuos en el contexto de sus antecedentes genéticos derivando así células que presenten comportamientos genéticos y epigenéticos que reflejen a las células del donante considerando así que son una herramienta para modelar enfermedades humanas. (26)

El principal desafío con las células iPSC para el modelado de enfermedades es establecer el tipo o tipos de células correctos con un fenotipo que represente con precisión los aspectos patológicos de la enfermedad de interés. Grupos de investigadores ya han utilizado iPSC para modelar la fisiopatología de diversas enfermedades cardiovasculares, neurológicas, hepáticas, renales y asociadas al cáncer entre otras. (26)

Las iPSC también podrían ser útiles para modelar enfermedades asociadas con el cáncer con características heredadas o en edades tempranas, ya que estos cánceres al ser de un inicio temprano podrían ser promovidos por el proceso de desarrollo embrionario en sí, que se podría abordar desde la diferenciación. (26)

Para el modelado de este tipo de enfermedades cancerígenas a pesar de tener un futuro bastante prometedor existe la limitación de que estas células no se someten a factores ambientales como la contaminación química, el tabaquismo, las infecciones por virus entre otras cuestiones externas. (26) Una preocupación importante sobre la elección del tipo de células donantes es que algunos tipos de células como los fibroblastos dérmicos derivados de biopsias de piel y las células sanguíneas pueden llevar consigo un mayor número de cargas mutacionales y anomalías cromosómicas, debido a su exposición a la radiación UV y a las altas tasas de renovación celular esto especialmente en donantes de edades avanzadas. (18)

Otra cuestión clave en cuanto a la generación de iPSC es el proceso de generación de este tipo de células y la selección del método óptimo, además de la elección y la combinación de los factores de reprogramación debido a la preocupación de que estos métodos causan oncogénesis. (18)

Otra preocupación es la producción de células fenotípicas clínicamente relevantes derivadas de iPSC de "grado clínico" con un sistema controlado, aprobado y a gran escala. Este tiempo de producción IPSC clínicamente aplicables puede ser crítico debido a que el tiempo estimado para cumplir con ciertos tratamientos no siempre podría cumplirse. Por lo cual lo ideal sería crear biobancos con líneas

celulares aprobadas de varios donantes homocigotos de antígenos que coincidiría con la mayoría de la población para generar células trasplantables aprobadas como un producto comercial cumpliendo siempre con los estándares de calidad y control, además de la autorización reglamentaria. (18)

11. Conclusiones

En conclusión los modelos de enfermedades de animales de compañía poseen un potencial significativo para contribuir a estudios multidisciplinarios con aquellas enfermedades que se parecen mucho a una enfermedad humana (síntomas, patología, asociaciones genéticas, respuestas terapéuticas (62)

Dado que los ensayos de células troncales en roedores la mayoría de las veces no puede predecir, reproducir y recapitular de forma tan similar los resultados en humanos, por otro lado, los animales de compañía nos acercarán más a similitudes con las enfermedades y a un menor fracaso en cuanto este tipo de terapias. (62)

Los estudios con animales de compañía pueden abrir nuevos caminos en la medicina regenerativa, a través de estudios de factibilidad piloto (Fase 1) seguridad y eficacia temprana (f2) y estudios de eficacia mayor (f3) que podrían ser demasiado prematuros o demasiado costos en humanos y a los cuales los rodean muchas cuestiones éticas por superar. (62)

Una medicina más aplicada en animales de compañía podría darnos un panorama más amplio para la comprensión de la complejidad de las funciones moleculares, las enfermedades y las terapias que podrían brindarse en humanos de manera más eficiente reduciendo fracasos en un futuro. (62) La perspectiva de la gravedad de la lesión, el inicio, el curso en el tiempo, los puntos variables de supervivencia, las variables no controladas (por ejemplo, co-morbilidades) y la refractariedad a las terapias. (62)

Una progresión desde el concepto hasta la cura de las enfermedades en este animal de compañía no solamente ayudaría a nuestros pacientes caninos y felinos

sino también a los pacientes humanos a poder avanzar en la medicina regenerativa. (65)

Dado que al menos la mitad de las enfermedades hereditarias caninas que se prueban en los principales estudios tienen equivalentes a las enfermedades en los humanos, el perro se convertirá cada vez más en un modelo de animal incomparable para desarrollar terapias y poder trasladar e implementar dichos conocimientos en humanos. (65)

Por lo tanto los componentes clave para cualquier tratamiento exitoso basado en iPSC será la capacidad para producir eficientemente células iPSC sin alteraciones genéticas con fines terapéuticos o con anomalías cariotípicas como modelo de enfermedades, para la generación de células a gran escala y para el estudio de enfermedades apropiadas en medicina regenerativa tanto en el pequeñas especies como en el humano. (65)

La capacidad de generar iPSC ha abierto sin lugar a dudas nuevas y grandes posibilidades para el estudio y desarrollo de nuevas tecnologías con los objetivos de modelado de enfermedades, desarrollar y probar farmacoterapias específicas, para cada paciente es decir la llamada terapia personalizada. En el campo del cáncer el estudio de estas células y su mecanismo de reprogramación podría generar una fuente celular para originar células inmunes con gran potencial para el desarrollo de inmunoterapias contra el cáncer. (26)

Los ensayos clínicos con células derivadas de iPSC para tratar enfermedades degenerativas y lesiones en órganos están en camino de convertir la esperanza en realidad y esto es solamente el comienzo de una poderosa plataforma regenerativa con resultados alentadores. Sin embargo, aún se tienen que superar muchos obstáculos y retos para traducir de manera efectiva el verdadero potencial que poseen estas células (18)

Aunque ya existen informes sobre la generación de iPSC a partir de pequeñas especies (perros y gatos) y aunque estas investigaciones son extremadamente prometedoras para la medicina veterinaria y para la medicina humana las

condiciones exactas necesarias para reprogramar las células somáticas de cada especie y mantener su estado de pluripotencia aún no se encuentran tan cercanas para ser descifradas y aplicadas en la clínica, sin embargo, el largo camino hacia este objetivo ha comenzado a ser recorrido. (61)

12. Referencias

1. Jaenisch R, Young R. Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell*. febrero de 2008;132(4):567-82.
2. Li M, Belmonte JCI. Looking to the future following 10 years of induced pluripotent stem cell technologies. *Nat Protoc*. septiembre de 2016;11(9):1579-85.
3. Briggs R, King TJ. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Natl Acad Sci* 38: 455-463.
4. Briggs R, King TJ. Changes in the nuclei of differentiating endoderm cells as revealed by nuclear transplantation. *J Morphol*. marzo de 1957;100(2):269-311.
5. Gurdon JB. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Developmental Biology*. abril de 1962;4(2):256-73.
6. Hochedlinger K, Jaenisch R. Induced Pluripotency and Epigenetic Reprogramming. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. diciembre de 2015;7(12):a019448.
7. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.
8. Eggen K, Baldwin K, Tackett M, Osborne J, Gogos J, Chess A, et al. Mice cloned from olfactory sensory neurons. *Nature*. marzo de 2004;428(6978):44-9.
9. Jaenisch R, Gurdon J. 2007. Nuclear transplantation and the reprogramming of the genome. In *Epigenetics* (ed. Allis CD, et al.), pp. 415-434.
10. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
11. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. agosto de 2006;126(4):663-76.
12. Cantz T, Martin U. Induced Pluripotent Stem Cells: Characteristics and Perspectives. En: Kasper C, Griensven M, Pörtner R, editores. *Bioreactor Systems for Tissue Engineering II* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010 [citado 25 de septiembre de 2019]. p. 107-26. Disponible en: http://link.springer.com/10.1007/10_2010_74
13. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nat Rev Drug Discov*. febrero de 2017;16(2):115-30.

14. Introducción al estudio de las células troncales (Curso de células troncales) Anzaldúa final (1).pdf.
15. Arce SRA, Mas MCR, Cortés MÁC, Ríos MAM. ¿Qué son las células troncales o “células madre”? What are stem cells or “mother cells”? 2007;25.
16. Feng C, Jia Y-D, Zhao X-Y. Pluripotency of Induced Pluripotent Stem Cells. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. octubre de 2013;11(5):299-303.
17. Liu S-P, Fu R-H, Huang Y-C, Chen S-Y, Chien Y-J, Hsu CY, et al. Induced Pluripotent Stem (iPS) Cell Research Overview. *Cell Transplantation*. febrero de 2011;20(1):15-9.
18. Li C, Chen S, Zhou Y, Zhao Y, Liu P, Cai J. Application of induced pluripotent stem cell transplants: Autologous or allogeneic? *Life Sciences*. noviembre de 2018;212:145-9.
19. Doss MX, Sachinidis A. Current Challenges of iPSC-Based Disease Modeling and Therapeutic Implications. *Cells*. 30 de abril de 2019;8(5):403.
20. Yamanaka S. Induced Pluripotent Stem Cells: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell*. junio de 2012;10(6):678-84.
21. Schneuwly S, Kuroiwa A, Gehring WJ. Molecular analysis of the dominant homeotic Antennapedia phenotype. *The EMBO Journal*. enero de 1987;6(1):201-6.
22. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a Single Transfected cDNA Converts Fibroblasts to Myoblasts. :14.
23. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. 1 de diciembre de 1988;336(6200):688-90.
24. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. julio de 1981;292(5819):154-6.
25. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, Durning M, Harris CP, Becker RA, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 15 de agosto de 1995;92(17):7844-8.
26. Liu P, Li K, Xu S. The future of iPS cells in advancing regenerative medicine. *Genetics Research [Internet]*. 2016 [citado 22 de agosto de 2019];98. Disponible en: https://www.cambridge.org/core/product/identifier/S001667231600001X/type/journal_article

27. Bragança J, Lopes JA, Mendes-Silva L, Santos JMA. Induced pluripotent stem cells, a giant leap for mankind therapeutic applications. *World Journal of Stem Cells*. 26 de julio de 2019;11(7):421-30
28. Rosenfeld P, Schwartz S, Blumenkranz M, Miller J, Haller J, Reimann J, et al. Maximum Tolerated Dose of a Humanized Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Antibody Fragment for Treating Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmology*. junio de 2005;112(6):1048-1053.e4.
29. Schwartz SD, Hubschman J-P, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *The Lancet*. febrero de 2012;379(9817):713-20.
30. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell*. julio de 2015;17(1):11-22.
31. Dutton L, Dudhia J, Guest DJ, Connolly DJ. Inducing pluripotency in the domestic cat (*Felis Catus*). *Stem Cells and Development* [Internet]. 7 de agosto de 2019 [citado 22 de agosto de 2019]; Disponible en: <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2019.0142>
32. Shimada H, Nakada A, Hashimoto Y, Shigeno K, Shionoya Y, Nakamura T. Generation of canine induced pluripotent stem cells by retroviral transduction and chemical inhibitors. *Mol Reprod Dev*. 4 de noviembre de 2009;77(1):2-2.
33. Luo J, Suhr ST, Chang EA, Wang K, Ross PJ, Nelson LL, et al. Generation of Leukemia Inhibitory Factor and Basic Fibroblast Growth Factor-Dependent Induced Pluripotent Stem Cells from Canine Adult Somatic Cells. *Stem Cells and Development*. octubre de 2011;20(10):1669-78.
34. Lee AS, Xu D, Plews JR, Nguyen PK, Nag D, Lyons JK, et al. Preclinical Derivation and Imaging of Autologously Transplanted Canine Induced Pluripotent Stem Cells. *J Biol Chem*. 16 de septiembre de 2011;286(37):32697-704.
35. Whitworth DJ, Ovchinnikov DA, Wolvetang EJ. Generation and Characterization of LIF-dependent Canine Induced Pluripotent Stem Cells from Adult Dermal Fibroblasts. *Stem Cells and Development*. 10 de agosto de 2012;21(12):2288-97.
36. Koh S, Thomas R, Tsai S, Bischoff S, Lim J-H, Breen M, et al. Growth Requirements and Chromosomal Instability of Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Adult Canine Fibroblasts. *Stem Cells and Development*. 15 de marzo de 2013;22(6):951-63.
37. Nishimura T, Hatoya S, Kanegi R, Sugiura K, Wijewardana V, Kuwamura M, et al. Generation of Functional Platelets from Canine Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells and Development*. 15 de julio de 2013;22(14):2026-35.

38. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science*. 7 de noviembre de 2008;322(5903):945-9.
39. Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science*. 7 de noviembre de 2008;322(5903):949-53.
40. Huangfu D, Osafune K, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Chen S, et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*. noviembre de 2008;26(11):1269-75.
41. Kumar D, Talluri T, Anand T, Kues W. Transposon-based reprogramming to induced pluripotency. *Histology and histopathology*. 24 de agosto de 2015;30:11656
42. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell*. mayo de 2009;4(5):381-4.
43. Waddington CH. The Epigenotype. *Int J Epidemiol*. febrero de 2012;41(1):10-3.
44. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh Y-H, Li H, Lau F, et al. Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell*. noviembre de 2010;7(5):618-30.
45. Hochedlinger K, Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*. 15 de febrero de 2009;136(4):509-23.
46. Pelayo R. P R, Santa -Olalla J., Velasco I. Libro CELULAS TRONCALES Y MEDICINA REGENERATIVA, ROSANA; SANTA OLALLA, JESUS; VELASCO, IV PELAYO, ISBN 9786070225680. Comprar en Buscalibre [Internet]. [cited 2019 Aug 20]. Available from: <https://www.buscalibre.com.mx/libro-celulas-troncales-y-medicina-regenerativa/9786070225680/p/46802284>
47. Chin MH, Mason MJ, Xie W, Volinia S, Singer M, Peterson C, et al. Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures. *Cell Stem Cell*. julio de 2009;5(1):111-23.
48. Ghosh Z, Wilson KD, Wu Y, Hu S, Quertermous T, Wu JC. Persistent Donor Cell Gene Expression among Human Induced Pluripotent Stem Cells Contributes to Differences with Human Embryonic Stem Cells. Huang S, editor. *PLoS ONE*. 1 de febrero de 2010;5(2):e8975.
49. Djuric U, Ellis J. Epigenetics of induced pluripotency, the seven-headed dragon. *Stem Cell Res Ther*. 2010;1(1):3.

50. Gomes KMS, Costa IC, Santos JF dos, Dourado PMM, Forni MF, Ferreira JCB. Induced pluripotent stem cells reprogramming: Epigenetics and applications in the regenerative medicine. *Rev Assoc Med Bras.* febrero de 2017;63(2):180-9.
51. Klug WS, Cummings MR, Spencer CA. *Conceptos de genética* (10a. ed.). Madrid: Pearson Educación; 2013.
52. Wang Y, Baskerville S, Shenoy A, Babiarz JE, Baehner L, Belloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs regulate the G1-S transition and promote rapid proliferation. *Nat Genet.* diciembre de 2008;40(12):1478-83.
53. Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, Liu JY, Bucay N, Derynck R, et al. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* mayo de 2011;29(5):443-8.
54. Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L, Sung H, Beyer TA, Datti A, et al. Functional Genomics Reveals a BMP-Driven Mesenchymal-to-Epithelial Transition in the Initiation of Somatic Cell Reprogramming. *Cell Stem Cell.* julio de 2010;7(1):64-77.
55. Li Z, Yang C-S, Nakashima K, Rana TM. Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation: RNA-based iPSC reprogramming. *The EMBO Journal.* 2 de marzo de 2011;30(5):823-34.
56. Li Z, Dang J, Chang K-Y, Rana TM. MicroRNA-mediated regulation of extracellular matrix formation modulates somatic cell reprogramming. *RNA.* diciembre de 2014;20(12):1900-15.
57. Li MA, He L. microRNAs as novel regulators of stem cell pluripotency and somatic cell reprogramming. *Bioessays.* agosto de 2012;34(8):670-80.
58. Choi YJ, Lin C-P, Ho JJ, He X, Okada N, Bu P, et al. miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nat Cell Biol.* noviembre de 2011;13(11):1353-60.
59. Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature.* septiembre de 2010;467(7313):285-90.
60. Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regenerative Medicine.* julio de 2011;6(4):481-92.
61. Verma R, Holland MK, Temple-Smith P, Verma PJ. Inducing pluripotency in somatic cells from the snow leopard (*Panthera uncia*), an endangered felid. *Theriogenology.* enero de 2012;77(1):220-228.e2.

62. Pieri NCG, de Souza AF, Botigelli RC, Machado LS, Ambrosio CE, dos Santos Martins D, et al. Stem cells on regenerative and reproductive science in domestic animals. *Veterinary Research Communications*. febrero de 2019;43(1):7-16.
63. Hoffman AM, Dow SW. Concise Review: Stem Cell Trials Using Companion Animal Disease Models. *STEM CELLS*. julio de 2016;34(7):1709-29.
64. Yamanaka S. A Fresh Look at iPS Cells. *Cell*. abril de 2009;137(1):13-7
65. Bragança J, Lopes JA, Mendes-Silva L, Santos JMA. Induced pluripotent stem cells, a giant leap for mankind therapeutic applications. *World Journal of Stem Cells*. 26 de julio de 2019;11(7):421-30
66. Betts DH, Tobias IC. Canine Pluripotent Stem Cells: Are They Ready for Clinical Applications? *Frontiers in Veterinary Science* [Internet]. 7 de octubre de 2015 [citado 22 de agosto de 2019];2. Disponible en: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fvets.2015.00041/abstract>
67. Nishikawa S, Goldstein RA, Nierras CR. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. septiembre de 2008;9(9):725-9.
68. Taguchi J, Yamada Y. In vivo reprogramming for tissue regeneration and organismal rejuvenation. *Current Opinion in Genetics & Development*. octubre de 2017;46:132-40.
69. Goya RG, Lehmann M, Chiavellini P, Canatelli-Mallat M, Hereñú CB, Brown OA. Rejuvenation by cell reprogramming: a new horizon in gerontology. *Stem Cell Res Ther*. diciembre de 2018;9(1):349.
70. Galkin F, Zhang B, Dmitriev SE, Gladyshev VN. Reversibility of irreversible aging. *Ageing Research Reviews*. enero de 2019;49:104-14.
71. Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. julio de 2007;448(7151):313-7.
72. Fusaki N, Ban H, Nishiyama A, Saeki K, Hasegawa M. 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*. 2009;85(8):348-62.
73. Breitbach M, Bostani T, Roell W, Xia Y, Dewald O, Nygren JM, et al. Potential risks of bone marrow cell transplantation into infarcted hearts. *Blood*. 15 de agosto de 2007;110(4):1362-9.
74. Chapel A, Bertho JM, Bensidhoum M, Fouillard L, Young RG, Frick J, et al. Mesenchymal stem cells home to injured tissues when co-infused with

hematopoietic cells to treat a radiation-induced multi-organ failure syndrome. *J Gene Med.* diciembre de 2003;5(12):1028-38.

75. Furlani D, Ugurlucan M, Ong L, Bieback K, Pittermann E, Westien I, et al. Is the intravascular administration of mesenchymal stem cells safe? *Microvascular Research.* mayo de 2009;77(3):370-6.