



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

REPROGRAMACIÓN NUCLEAR *IN VIVO* Y REJUVENECIMIENTO DEL ORGANISMO. PERSPECTIVAS Y RETOS EN MEDICINA VETERINARIA DE PERROS Y GATOS (ESTUDIO RECAPITULATIVO)

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

PRESENTA:

BENJAMIN JOSÉ DE JESUS DÍAZ GONZÁLEZ

ASESOR (ES)

SANTIAGO RENÉ ANZALDÚA ARCE

HÉCTOR VILLASEÑOR GAONA



Ciudad universitaria, Cd. Mx

2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

TÍTULO:

Reprogramación nuclear *in vivo* y rejuvenecimiento del organismo. Perspectivas y retos en Medicina Veterinaria de perros y gatos (estudio recapitulativo).

Alumno: Benjamin José de Jesus Díaz González

Tutores: MVZ Santiago René Anzaldúa Arce, MVZ Héctor Villaseñor Gaona

AGRADECIMIENTOS

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 N: 223520, Titulado “Caracterización histomorfológica y análisis histoquímico de células con marcadores de pluripotencia en órganos del tracto reproductor de perras de diferentes edades”

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a todas las personas que de alguna manera influyeron en mi vida, creyeron en mí, me motivaron e impulsaron a seguir adelante, a no rendirme nunca, en especial a mis hermanas Olivia y Verónica, a mis sobrinos Jorge, Omar, Catalina y Gael, a todos y cada uno de los maestros que tuve en la licenciatura y a los que estuvieron conmigo desde la infancia; maestros de vida y académicos, sin olvidar a quienes fueron los iniciadores de este gran proyecto de vida: Catalina González y Juan Díaz, que aunque en el cielo nunca me dejaron solo.

INDICE

I TÍTULO.....	1
Resumen	3
II INTRODUCCIÓN.....	4
III REVISION SISTEMÁTICA PROCEDIMIENTO.....	8
IV. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN.....	9
BIOLOGÍA DEL ENVEJECIMIENTO.....	9

a) Teorías sobre el envejecimiento.....	9	
b) Modificaciones epigenéticas durante el envejecimiento.....	11	
c) Células troncales y envejecimiento.....	14	
TÍPOS DE REPROGRAMACIÓN NUCLEAR.....	19	
a) Desdiferenciación, transdiferenciación y reprogramación.....	19	
b) Transferencia nuclear de células somáticas (SCNT).....	20	
c) Fusión celular.....	21	
d) Reprogramación <i>in vitro</i> : Células troncales pluripotenciales inducidas (iPS).....	21	
REPROGRAMACIÓN <i>IN VIVO</i> Y REJUVENECIMIENTO DEL ORGANÍSMO.....	23	
a) Concepto de rejuvenecimiento del organismo.....	23	
b) Epigenética de la reprogramación.....	25	
c) Envejecimiento irreversible.....	26	
d) Rejuvenecimiento del organismo.....	27	
e) Reemplazo celular por reprogramación <i>in vivo</i>	28	
f) Estrategias antienvjecimiento mediante reprogramación <i>in vivo</i> ..	29	
PERSPECTIVAS DE LA REPROGRAMACIÓN <i>IN VIVO</i> EN LA MEDICINA REGENERATIVA DE PERROS Y GATOS.....	32	
a) Rejuvenecimiento de cardiomiocitos.....	37	
b) Rejuvenecimiento de neuronas.....	39	
c) Rejuvenecimiento de células B pancreáticas.		
RETOS E INCONVENIENTES DE LA REPROGRAMACIÓN <i>IN VIVO</i>	42	
CONCLUSIONES.....	47	
REFERENCIAS.....	49	

Resumen

Se llevó a cabo el estudio recapitulativo sobre la reprogramación nuclear *in vivo* y rejuvenecimiento del organismo y las perspectivas y retos en Medicina Veterinaria de perros y gatos. Originalmente el concepto clásico de la diferenciación celular como un proceso unidireccional e irreversible fue presentado mediante el “pasaje epigenético” de Waddington en 1957. Con el descubrimiento de la clonación animal inicialmente en ranas y posteriormente en mamíferos, además del desarrollo subsecuente de la tecnología de la reprogramación celular mediante la inducción de pluripotencia en células somáticas utilizando un grupo de 4 factores de transcripción (*Oct3/4, Sox2, Klf4* y *c-Myc*; *OSKM*), fueron grandes los progresos que permitieron abordar el concepto de rejuvenecimiento del organismo por reprogramación *in vivo* y la visión emergente de que el envejecimiento es un proceso epigenético reversible, puesto que las modificaciones epigenéticas no requieren modificaciones en las secuencias de bases del DNA, es decir en el genoma, por lo que esta tecnología puede usarse para modificar activamente la regulación epigenética. Una posible aplicación inicial de la reprogramación del rejuvenecimiento *in vivo* pudiera ser el prevenir el envejecimiento individual y así tratar de eliminar los mayores factores de riesgo de las patologías asociadas con el final de la vida como son el cáncer, la obesidad, lesiones dentales, el incremento del peso corporal, enfermedades hepáticas, neurodegenerativas y diabetes, entre otras. Además, se sabe que la tecnología de reprogramación *in vivo* puede abrogar las aberraciones epigenéticas asociadas al envejecimiento y al cáncer, del mismo modo puede intentarse un rejuvenecimiento gradual de todo el organismo. Así, surgen las siguientes preguntas: ¿Cómo puede lograrse la

irreversibilidad del envejecimiento de algunas partes del cuerpo como son: las neuronas, los cardiomiocitos, miocitos estriados esqueléticos, células del cristalino o los dientes? y ¿cómo puede reconciliarse con el rejuvenecimiento de otras partes del mismo organismo? ¿CUáles son los efectos autónomos o no celulares de la reprogramación *in vivo*? Las respuestas de estas preguntas podrían conllevar a extender en forma dramática el promedio de vida que no puede lograrse mediante las aproximaciones tradicionales como la genética, la dieta o la farmacología. Los conceptos críticos en estos retos constituyen la naturaleza del envejecimiento, relación entre envejecimiento de un organismo y el envejecimiento de sus partes, relación entre desdiferenciación celular y rejuvenecimiento y en incremento del riesgo del cáncer que va de la mano con el abordaje del rejuvenecimiento, con las siguientes perspectivas; llevar a cabo la reprogramación *in vivo* en perros y gatos mediante la utilización de los OSKM (Oct 4 Sox 2, Kfl 4 y c- MYC), desarrollando procedimientos que eviten la utilización de retrovirus por la integración genética y oncogenes, mediante lentivirus o moléculas pequeñas (como inhibidores de enzimas remodeladores de la cromatina), teniendo como objetivo inicial evitar las complicaciones propias de la edad avanzada que inciden en la mortalidad. Los principales riesgos a enfrentar serán: evitar la reprogramación ectópica, la tumorigénesis, la irreversibilidad de la reprogramación, favorecer la integración funcional de las células reprogramadas e inducir la plasticidad celular pero sin la tumorigénesis, determinar si es conveniente una reprogramación generalizada o específica de algún órgano o tejido de preferencia vitales y saber si estos mecanismos de reprogramación pueden realmente extender la vida útil de los pacientes sin recurrir a las terapias de injertos o reemplazos. Concluyendo que la aplicación clínica requiere de vencer previamente las limitaciones y retos ya descritos. El perro y el gato representan modelos biológicos muy relevantes para el estudio de la senescencia y el rejuvenecimiento por compartir con el humano diversas alteraciones patológicas propias de la edad avanzada. La reprogramación deberá privilegiar órganos vitales responsables de alta mortalidad como son el hígado, el riñón, el páncreas, el tejido nervioso y órganos limitantes propios de la senilidad como son la sarcopenia, caquexia y las lesiones o pérdidas dentales. La gonadectomía parece ser un factor importante para extender la vida de perros y gatos, por lo que se tendrá que indagar más al respecto.

Palabras clave

Rejuvenecimiento del organismo, reprogramación *in vivo*, pluripotencia, células troncales.

II. INTRODUCCIÓN

Todos los órganos del cuerpo de los mamíferos domésticos y el humano constan de 220 tipos celulares distintos que se diferenciaron inicialmente de un cigoto (célula totipotencial). Antiguamente, el proceso de diferenciación, particularmente en los mamíferos era considerado un proceso unidireccional e irreversible, en donde se pensaba que las células diferenciadas eran incapaces de revertir ese proceso, además de originar tipos celulares diferentes a los de su linaje o especialización. Este concepto clásico fue resumido por Waddington en el año de 1957 mediante “pasajes epigenéticos” llamados pasajes epigenéticos de Waddington (1), que es una representación esquemática a través de valles y crestas y que indican en la parte superior (crestas) la ubicación de células indiferenciadas (totipotentes y Pluripotentes) y conforme se desciende hacia los valles se van diferenciando en diversos linajes celulares. El paisaje epigenético permite explicar de manera visual los procesos de diferenciación, transdiferenciación y reprogramación. Briggs y King (2) establecieron la técnica de Transferencia Nuclear de Células Somáticas (SCNT) o “clonación”, y junto con los experimentos de John Gurdon (1962) (2) y de Ian Wilmut (1997) (3), se demostró que los núcleos de las células somáticas adultas diferenciadas podrían ser reprogramados a un estado embrionario. Uno de los grandes descubrimientos en el estudio de las células troncales y la medicina regenerativa se llevó a cabo en el 2006 cuando Sinya Yamanaka y Takahashi lograron la reprogramación de células somáticas (fibroblastos de piel), en células troncales pluripotenciales inducidas (iPSC) (4) mediante la expresión forzada de factores de transcripción propios de células troncales embrionarias (ESC): Oct 4, Sox-2, c-MYC y Klf 4 (OSMK o factores de Yamanaka) (4). Las células pluripotenciales son aquellas que pueden originar a los 220 tipos celulares del organismo, excepto los anexos embrionarios (5).

Todos estos experimentos previos, han permitido modificar nuestra concepción sobre la irreversibilidad del proceso de diferenciación y el pasaje epigenético de Waddington haciéndolo más flexible y con rutas de retroceso (6). Este nuevo panorama, ha sido muy importante para algunos científicos que han propuesto la posibilidad de tratar de reprogramar todas las células somáticas del organismo; proceso conocido como reprogramación *in vivo* (6).

Actualmente se estudia la posibilidad de realizar la reprogramación de células somáticas envejecidas *in vivo* mediante la inducción en la expresión de los genes OSMK, lo que podría significar un proceso de reversibilidad del envejecimiento del

organismo en individuos seniles, lo que sin duda marcaría un parte aguas en la medicina regenerativa (6–11).

Uno de los objetivos de la medicina regenerativa es tratar de evitar la generación de las lesiones tisulares y el deterioro funcional de los diferentes órganos y sistemas. La derivación de células troncales pluripotentes, ya sea células troncales embrionarias (ESC) o troncales pluripotenciales inducidas (iPSC), ocupa un lugar crucial en las estrategias de estudio, debido a sus propiedades de autorrenovación y la posibilidad de expandirlas de manera indefinida y diferenciarlas de manera controlada *in vitro* (8). Durante la reprogramación se lleva a cabo una reorganización dinámica de la regulación epigenética del material genético de las células, esta reorganización por definición no conlleva modificaciones en la secuencia de los nucleótidos del ADN, lo cual implica una gran ventaja y hace el proceso más flexible y con mayores posibilidades de intervención (12). Aunque la reprogramación *in vivo* ha sido estudiada, se ha informado de estudios que indican que las células somáticas son reprogramables en organismos multicelulares *in vivo* (13–15).

El envejecimiento representa un proceso biológico normal de los organismos, que implica pérdida de la integridad biológica, disminución de la movilidad e independencia, tienen mayores posibilidades de desarrollar cáncer y requieren de un mayor cuidado personal y de la salud, todos estos elementos implican mayores costos y cuidados en la atención de los pacientes (16).

Desafortunadamente la reprogramación hacia el estado pluripotente comparte muchas propiedades con un eventual desarrollo de cáncer, incluida la adquisición de un potencial de auto-renovación, y la pérdida de la identidad de las células somáticas originales, además de la adquisición de propiedades de células troncales que a menudo se observa durante la carcinogénesis en muchos órganos (12).

El presente trabajo pretende compendiar los conocimientos más recientes sobre la reprogramación *in vivo*, mediante la consulta metódica de la bibliografía disponible en los principales buscadores científicos de los últimos 20 años, como son Googlee Scholar, Science Direct y PubMed (y en el área médica de manera específica: PubMed, Trip Database, HONcode Search, evidence search y Medscape), para dar un panorama general sobre esta nueva tecnología de reprogramación *in vivo*.

La tesis se dividió en varias secciones, tal como se muestra en el índice propuesto, de manera general, en la primera sección se describen los principales conceptos biológicos del envejecimiento, junto con las modificaciones epigenéticas que conllevan la posible participación en este proceso de las células troncales.

Existe cada día mayor evidencia que indica que la disminución funcional de las células troncales en individuos seniles contribuye al menos en parte a los cambios fisiopatológicos propios del envejecimiento en diferentes órganos y tejidos. Los cambios relacionados con la edad también implican a los nichos donde se ubican las células troncales (17). Entre las alteraciones observadas en las células troncales más estudiadas que son las hematopoyéticas (HSC) se encuentran la reparación del ADN y remodelación de la cromatina.

Se ha también postulado que los daños microambientales sobre las células troncales mesenquimales podría ser el llamado fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) (secreción de interleucina 6). Se ha observado que las células troncales mesenquimales (MSC) provenientes de la médula ósea de individuos envejecidos tienen menos capacidad de diferenciación en células musculares o de hueso y mayor capacidad en adipocitos. (17). Un ejemplo de los cambios fisiopatológicos asociados con la edad y el envejecimiento de las células troncales es el caso de los pericitos (células presentes alrededor de los vasos sanguíneos) con la edad tienden a diferenciarse en linajes osteogénicos lo que se traduce en una mayor propensión a generar calcificaciones ectópicas en las arterias y válvulas cardíacas (18)

En una segunda sección se aportó un panorama sobre los diferentes tipos de reprogramación nuclear que existen (transferencia nuclear de células somáticas, fusión celular, reprogramación *in vitro* y reprogramación *in vivo*), marcando sus principales características y sus diferencias con los mecanismos de desdiferenciación, transdiferenciación y reprogramación.

En la última sección se desarrolló la reprogramación *in vitro* como una alternativa para inducir el rejuvenecimiento del organismo, junto con las modificaciones epigenéticas que esto representaría, el reemplazo celular por reprogramación *in vivo* y las estrategias de antienvjecimiento. Finalmente se dio un panorama sobre los abordajes relacionados con la investigación del tema en pequeñas especies (perros y gatos) y los retos e inconvenientes de su implementación.

En Medicina Veterinaria de pequeñas especies (perros y gatos) se desarrolló en el 2006 por primera vez una línea celular de células ESC a partir de células del blastocisto canino por Hatoya y col. (19). Sin embargo en el 2008 fueron reportadas las primeras ESC de perros capaces de producir teratomas (20). Se informó en el 2010 sobre las primeras células iPSC generadas a partir de fibroblastos embrionarios por Shimada y col (21). Finalmente se logró la obtención de iPSC a partir de fibroblastos y células adiposas de la piel de perros en el 2011 (Lee et al 2011) (22).

La primera reprogramación nuclear de células somáticas permitió la primera clonación canina de un animal llamado Snupy en el 2005 por Lee y col (23); así mismo la primera clonación de un gato se realizó en ese mismo año (Shin et al 2005) (24).

La reprogramación *in vivo* en estas especies aun no es una realidad, pero puede significar un procedimiento de gran ayuda en la medicina veterinaria de pequeñas especies (perros y gatos) si se logran vencer los retos y obstáculos que se prevén en el camino, como pueden ser falta de presupuesto, falta de interés, consideraciones éticas y disminución o control de posibles efectos secundarios.

III. REVISION SISTEMÁTICA PROCEDIMIENTO

Se realizó una búsqueda de la información en dos fuentes: la primera fue 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 se hizo referencia a conceptos generales sobre el envejecimiento (“Biología del envejecimiento”), se buscó 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 fueron: título (correspondientes al grado de especialización del texto), año de publicación, utilizando los más recientes a los que se pudo acceder al momento de la elaboración del trabajo.

Para la segunda parte del trabajo (“Tipos de reprogramación nuclear y Reprogramación *in vivo* y rejuvenecimiento del organismo”) se utilizaron artículos indexados especializados en el tema mediante los siguientes buscadores en internet: Googlee Scholar, Science Direct y PubMed. Las bases de datos utilizadas fueron: EBSCO y Ovid. Las palabras claves utilizadas fueron: “stem cells”, “regenerative veterinary medicine”, “*in vivo* reprgramming”, “organism rejuvenation”, “aging”, “dog”, “cat”.

Se seleccionaron aquellos artículos publicados en revistas indexadas, preferentemente de entre los años 2006-2019, además de incluir algunos artículos clásicos por su importancia científica e histórica.

IV. ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

BIOLOGÍA DEL ENVEJECIMIENTO

a) TEORIAS DEL ENVEJECIMIENTO

Definir el envejecimiento no es un asunto sencillo, porque implica muchas vertientes biológicas, sin embargo, de manera general puede definirse como la suma de todas las modificaciones que ocurren en el organismo con el paso del tiempo y que conllevan a pérdidas funcionales múltiples hasta terminar con la muerte.(25). Puede decirse que el envejecimiento comienza cuando termina el desarrollo somático, el envejecimiento se manifiesta en el momento de máxima vitalidad, alrededor de los 30 años, para la especie humana. Un concepto importante que debe considerarse es el envejecimiento diferencial, pues no todos los individuos envejecen al mismo tiempo (al mismo ritmo) , tampoco lo hacen todos los órganos del mismo individuo (25).

Mientras el envejecimiento puede comenzar en etapas tempranas de la vida, la senescencia se reserva para las etapas tardías en las que los cambios involutivos son más evidentes y conducen en última instancia a la muerte.

La longevidad de una especie es también determinada genéticamente, en el ser humano es sabido que hay personas hasta con 120 años de edad en ciertos lugares como aldeas del Cáucaso en Siberia y en lugares andinos del Ecuador se menciona la existencia de personas que han vivido 130 años o más, sin embargo, no ha podido documentarse adecuadamente la edad real de estas personas por lo que se debe cifrar en 120 años la edad máxima del ser humano (25).

Entre las teorías más prominentes sobre el envejecimiento se encuentra la de Harman de 1956 sobre las especies reactivas del oxígeno (radicales de oxígeno libres) como los agentes responsables de generar los daños propios del envejecimiento, del español Jaime Miquel, quién amplió la teoría anterior mediante la 2da teoría mitocondrial de los radicales libres y el envejecimiento”(26).

Se considera que el envejecimiento es exclusivo de las células post-mitóticas, es decir propio de los organismos pluricelulares, pero mediante experimentos en cultivos celulares de pulmón (neumocitos) Hayflick determinó que las células aisladas presentaban un número determinado de divisiones mitóticas que estaban determinadas genéticamente, definiéndose así el llamado “límite de Hayflick”, el cual menciona que para el ser humano es de alrededor de 80 divisiones mitóticas después de las cuales la célula ya no puede dividirse y muere por apoptosis (25). En otras especies como el perro, este número es menor debido a que guarda una relación directa con la longevidad de la especie a la que se refiera (25). La base molecular del límite de Hayflick es la incapacidad de la DNA polimerasa de copiar por completo la molécula de DNA, de tal forma que en cada división mitótica se acorta el telómero de los cromosomas hasta llegar al límite de Hayflick, donde el DNA ya no puede duplicarse, a partir del cual la célula y el organismo comienzan a envejecer.

Las dos teorías anteriores no son mutuamente excluyentes sino que más bien están entrelazadas, pues cuando se llega al límite de Hayflick al no poderse dividir la célula empieza a sufrir los estragos asociados a las especies reactivas de oxígeno, del mismo modo estos últimos controlan además la acción de la DNA polimerasa (25).

Por otro lado, existe la teoría de la señalización por insulina, conocida como la vía de la insulina, la cual se basa en la disminución del factor de crecimiento similar a la insulina Factor de Crecimiento Tipo Insulina I (IGF-1), también conocido como somatomedina “C”, el cual es importante para alargar la vida, así todas las señales

que interfieren con la vía de señalización de insulina tienen una gran relevancia con el envejecimiento.

Desde los años 80's se ha postulado la teoría del daño acumulativo del DNA por las especies reactivas de oxígeno, principalmente de origen mitocondrial, esta teoría ha tenido amplia aceptación entre gerontólogos tradicionales (28). Mediante restricción calórica el proceso de envejecimiento aunque irreversible puede hacerse más lento, sin embargo a nivel experimental existen evidencias que contradicen este modelo, un ejemplo lo constituye un roedor, la rata topo desnuda que vive en promedio más de 8 veces (28.3 años) que su contraparte los roedores de laboratorio que llegan a vivir entre 3 y 3.5 años a pesar de mostrar un daño oxidativo bastante elevado en sus células, incluso provenientes de animales jóvenes (29), esto demuestra que el daño acumulativo al DNA no parece ser relevante en el proceso de envejecimiento en esta especie (30).

Una teoría más reciente se basa en la idea del "reloj epigenético", basado en la reprogramación de las células somáticas, que sugiere que en los metazoarios, las características del epigenoma son la parte central del envejecimiento, en el que el grado de metilación del DNA en las llamadas "islas CpG" (citosinas que forman dímeros con guaninas en regiones próximas a promotores de los genes) parece ser un marcador biológico altamente confiable. Stephen Horvath diseñó un algoritmo matemático que correlaciona el estado de metilación del DNA con la edad (llamado valor beta), esta metilación se obtiene de 353 CpG's dentro del genoma humano y genera un número expresado en años, esta predicción muestra una alta correlación (0.96) con la edad cronológica real y un margen de error calculado en 3.6 años (31).

El reloj epigenético también es útil para explicar algunas patologías como la enfermedad de Huntington y Parkinson; está asociado a un envejecimiento epigenético acelerado, y de manera inversa los individuos muy longevos presentan una tasa de envejecimiento epigenético más lenta de lo normal (30)

El modelo epigenético plantea que cuando se engendra un nuevo ser, su reloj epigenético sufre una regresión a "cero", por los factores de reprogramación presentes en el citoplasma del óvulo recién fecundado, mientras que el modelo del daño al DNA debe considerar la edad de los progenitores ya que aunque sea una pareja joven cada uno tienen asociado un cierto daño acumulado en su DNA, por lo que el cigoto debería heredar ese daño genético mínimo, que con el paso de las

generaciones se tendría que amplificar; sin embargo esto no ocurre porque el nuevo ser presenta un reloj epigenético de cada uno de los cigotos (sin importar a que generación pertenezca), se reinicia prácticamente a “cero”, de tal forma que de acuerdo con el modelo del reloj epigenético, en el momento de la fertilización en el cigoto todas las marcas del envejecimiento epigenético se borran por lo que se restablece su reloj epigenético a “cero” (30)

b) MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Las modificaciones epigenéticas durante el envejecimiento se reflejan en la remodelación de la cromatina y modificaciones en las histonas; estos procesos pueden tomarse entonces como marcadores del envejecimiento.

Todas estas modificaciones epigenéticas de un individuo en un momento dado o etapa de la vida se conocen como epigenoma. El epigenoma se considera, en los animales seniles el motor central del envejecimiento, siendo hasta cierto punto un proceso reversible (32)

Descubrimientos recientes señalan que el nivel de metilación del DNA se conoce como un “reloj epigenético”. La metilación que es un proceso por el cual se añaden grupos metilo al DNA reprimiendo la transcripción génica, siendo esencial para el desarrollo normal de la célula, ocurre en un conjunto de dinucleótidos de citosina y guanina (CpG), ubicadas en posiciones precisas a lo largo del genoma, siendo éste un biomarcador del envejecimiento muy confiable (33).

Stephen Horvath (33) ideó un algoritmo matemático que permite predecir la edad en múltiples tejidos u órganos, dicho algoritmo se basa en el estado de metilación de acuerdo a la edad (estimado a través del llamado valor beta) de 353 CpGs, localizados en regiones específicas a través del genoma humano, el cual se basa en la participación de una proteína o factor de transcripción llamado proteína de unión potenciadora beta EBP β (de acuerdo a sus siglas en inglés) en los sitio de desmetilación en las 353 CpG’s del cuerpo o tejidos humanos(34). Este algoritmo genera un número expresado en años que corresponde a la edad epigenética del individuo. En la especie humana se ha obtenido una correlación del 0.96 de la edad cronológica, con un margen de error de 3.6 años (35). Este proceso matemático constituye un excelente biomarcador de la estimación de la edad y supera por mucho todos los biomarcadores existentes hasta ahora.

Se sabe que el reloj epigenético predice con muy alta precisión siempre y cuando el DNA se obtenga de los siguientes tejidos: corteza occipital, colon, epitelio bucal, células mononucleares de sangre periférica, hígado, saliva, tejido adiposo, pulmón y cuello uterino (35).

La tasa de cambio de la metilación del DNA en los CpGs de acuerdo a la edad es muy alta en el ser humano desde el nacimiento y hasta el primer año de vida, posteriormente disminuye progresivamente entre 1 y 20 años de edad, y a partir de ese momento cambia a una tasa mucho más lenta (35). Esta tasa (cambio en la metilación del ADN) representa la tasa del “tic tac” del reloj epigenético; al parecer la esperanza de vida está asociada a la tasa de tics después de los 20 años de edad, cuando un ser humano ha alcanzado su madurez y no está asociada a la cantidad total de tics del reloj epigenético en general(35).

Al parecer la genética determina de manera principal la tasa de envejecimiento epigenético, de tal manera que es mucho más lenta en los individuos centenarios y sus descendientes(36).

El reloj epigenético es un predictor preciso de la edad cronológica cuando se trata de un envejecimiento normal, ya que en condiciones patológicas como en la enfermedad de Huntington y Parkinson presentan un envejecimiento epigenético acelerado, y en estos casos el valor que se obtiene representa solo la edad biológica más que la cronológica (37,38).

En las células jóvenes existe un estado relativamente alto de represión de expresión genética, en parte la metilación del DNA, particularmente a nivel de los promotores de los genes y también una relativa metilación de las histona H3 (trimetilación en la lisina 27 y en la lisina 9) y H4 (trimetilada en la lisina 20), estas modificaciones covalentes en las histonas están estrechamente asociados con la represión de la cromatina. Se ha documentado, que de manera contraria las células que envejecen, cambian sutilmente sus patrones de metilación ya que experimentan una hipometilación global lo que se traduce en una progresiva desrepresión de la actividad transcripcional, sin embargo ocurre también una hipermetilación progresiva de un grupo selectivo de genes que potencialmente permanecerán silenciados de manera permanente, algunos de estos genes corresponden a genes supresores de tumores y a oncogenes por lo que la pérdida en el primer caso, o ganancia en el segundo se ha relacionado con el desarrollo del cáncer (39). Los factores que influyen en los procesos de metilación tanto del DNA como de las histonas son múltiples y complejos, algunos de ellos influidos

por el medio ambiente e incluso el estado metabólico, se sabe que algunos metabolitos como son la CoA y la S-adenosil metionina proporcionan grupos acetilos a las lisinas acetiltransferasas en el primer caso, o grupos metilos utilizados por lisina metiltransferasa para favorecer la acetilación o metilación de las lisinas de histonas como reguladores epigenéticos influidos por el estado nutricional y metabólico del individuo (40).

Debido a que las modificaciones epigenéticas corresponden a la formación de enlaces covalentes en el DNA o las histonas, pero no intervienen en la secuencia de nucleótidos del DNA (no se consideran cambios genéticos), es posible que estos mecanismos sean reversibles y favorezcan la reprogramación epigenética, de tal manera que es factible que un ratón de dos meses (41) o un ser humano con una edad cronológica de 30 años (33) puedan reprogramar sus células somáticas mediante la generación de iPSCs (células troncales pluripotenciales inducidas) utilizando para ello los factores de Yamanaka, revirtiendo su edad epigenética a cero meses o años respectivamente con lo que pueden comportarse como células embrionarias.

Yamanaka y Takahasi supusieron que los factores de transcripción que tienen una función muy relevante en el mantenimiento del estado pluripotente en las ESC podrían inducir o reprogramar a un estado de pluripotencia a células somáticas completamente diferenciadas. Inicialmente seleccionaron 24 factores o genes como candidatos y posteriormente mediante un ingenioso experimento en el que se utilizaron ratones transgénicos con una construcción genética en el que se introdujo un gen de selección de resistencia al antibiótico neomicina (G418) insertado por recombinación homóloga en un sitio (locus) del gen Fbx 15, este gen tenía la característica de activarse de manera exclusiva en células pluripotentes, por lo que el resto de las células del ratón eran sensibles al antibiótico. Se forzó la expresión de los 24 genes candidatos en células diferenciadas provenientes de estos ratones transgénicos y se identificó qué genes mostraban o inducían la activación del promotor de Fbx 15 identificando estas células mediante la resistencia al antibiótico (G418), esta activación conllevaba la activación de genes de pluripotencia. Como resultado de estos experimentos se identificaron 4 genes o factores Oct4 y Sox2 que se sabía que contribuían a mantener la pluripotencia en células embrionarias y en ESC, también c-Myc y Klf4 responsables de mantener el fenotipo pluripotente en ESC, además de una proliferación rápida. Posteriormente mediante el empleo de retrovirus que se utilizaron como vectores se introdujeron y se indujo la expresión forzada de estos 4 genes en fibroblastos de la cola de ratones, posteriormente a las células resultantes se les llamó células pluripotentes inducidas o iPS y a estos 4 genes maestros se les denominó como los factores de

“Yamanaka”. Las iPS presentaron fenotipo de crecimiento y una morfología muy similar al de las ESC, se realizaron varias pruebas de pluripotencia como la formación de teratomas, cuerpos embrioides, pero no se pudieron obtener animales quimera en este experimento pionero (38–40)

Todo esto posibilitaría a ser realidad el rejuvenecimiento de un gran número de células del organismo.

c) CÉLULAS TRONCALES Y ENVEJECIMIENTO

Existen dos características biológicas muy importantes que caracterizan al envejecimiento tisular: El incremento en el número de células seniles y la disminución en la capacidad de regeneración tisular debido a la pérdida de proliferación de las células troncales(42).

Adicionalmente el grado de envejecimiento de un tejido se puede atribuir a la disfunción de las células troncales, por lo que la degeneración de los diferentes tejidos y órganos puede diferir entre sí, debido al daño en sus células troncales residentes, ya que debe existir un equilibrio entre la autorrenovación y la diferenciación de las células troncales. La pérdida de esta homeostasis o equilibrio puede conducir a la formación de tumores (proliferación excesiva de células troncales o progenitoras), o bien a la degeneración tisular (ocasionada por la disminución de las células troncales). Se ha propuesto que el envejecimiento tisular surgió como una alteración al mecanismo de supresión tumoral, en el que la actividad supresora reduce también el funcionamiento normal de las células troncales en etapas avanzadas de la vida, reduciendo la formación de tumores, pero además disminuyendo la capacidad regenerativa tisular (43).

En el caso de las células troncales hematopoyéticas (HSC) murinas de animales seniles, hay una disminución en su función hematopoyética, a pesar de que existe un aumento en el número total de ellas con diferentes fenotipos, La alteración más evidente se refiere a la tendencia a diferenciarse en el linaje mielóide en lugar del linfóide(44). Aunque la causa de esto se desconoce se ha sugerido que se incrementa el porcentaje de células progenitoras mieloides con la edad a expensas de las células progenitoras linfoides, por lo que la diferenciación mielóide parece proliferar mejor y acumularse en la médula ósea de individuos seniles (45).

Como se ha mencionado anteriormente, se ha sugerido que los niveles de metilación del DNA en los diferentes tejidos puede ser un marcador adecuado de la edad molecular de las células de origen, particularmente la hipermetilación preferencial en las islas CpG, sin embargo las células troncales embrionarias (ESC) y las iPSCs no parecen aumentar los niveles de metilación del DNA en estas mismas islas, independientemente del número de replicaciones del DNA que lleven a cabo en sus respectivas poblaciones. De acuerdo a la hipótesis de Horvat (33), la reprogramación epigenética en las células iPSCs puede restablecer el “reloj epigenético” a cero, con lo que la reversión de las modificaciones epigenéticas de las células envejecidas podrían también revertir los cambios propios de la edad. En experimentos en los que se generaron animales quimera producidos por la inyección de iPSCs en embriones en la etapa de blastocisto y su posterior implantación en hembras pseudo-gestantes, se observó que la distribución de los linajes hematopoyéticos derivados del iPSCs fue muy similar a los derivados de las células del blastocisto original. Se podría esperar que las HSC derivadas de las iPSCs mostraran características más “juveniles” de lo que se observó, por lo tanto no es posible que las modificaciones epigenéticas o el acumulo de DNA dañado pueda ser la causa significativa del proceso de envejecimiento. Este dilema podría resolverse si se pudieran generar iPSCs a partir de HSC verdaderamente envejecidas(45).

Otro tipo de células troncales estudiadas durante el envejecimiento son las MSC. De acuerdo a diversos estudios se sugiere que la funcionalidad de las MSC cambia con la edad del donante, de tal manera que en animales viejos se reduce la diferenciación a hueso (osteogénica) o a musculo (miogénica), pero se incrementa la del tejido adiposo (adipogénica) (46).

Estas alteraciones en la capacidad de diferenciación de las MSC parecen depender de su localización anatómica, por lo que en la medula ósea se disminuye la diferenciación de MSC a osteoblastos y se favorece la de adipositos; en cambio en las MSC presentes en los vasos sanguíneos (también conocidos como pericitos) existe una propensión creciente a diferenciarse en células óseas que puedan contribuir a la calcificación ectópica de las válvulas cardiacas y las arterias (47).

En la progeria “enfermedad de Hutchinson-Gilford” existe una mutación de la lámina A, que es un componente fibrilar que mantiene firme la estructura del núcleo celular y participa en la organización de la cromatina, presentandose una

degeneración extensa de los tejidos de origen mesenquimal, lo que sugiere que esta mutación tiene un impacto relevante en la función de más MSC, también se sabe que la expresión ectópica de lámina A y su homólogo de maduración alternativa, la progeria, induce disfunciones de la MSC, de manera similar a las presentes en células MSC de pacientes con progeria. Las modificaciones en la maduración alternativa de varios genes, incluido la lámina A, ocurren a medida que los telómeros se acortan y las células se aproximan a la etapa senil, por lo que los bajos niveles de progeria puedan acumularse durante el envejecimiento normal, y reflejen simplemente la presencia de pequeñas cantidades de células seniles presentes en el organismo. Aunque no se sabe la causa entre la longitud de los telómeros (o la actividad de la telomerasa) y los cambios de la maduración alternativa, podría esperarse que el mantenimiento de las longitudes de los telómeros en las MSC (ya que la telomerasa es activa en las MSC aunque solo en forma transitoria), reduzca el impacto de la progeria en el deterioro funcional de estas células. De tal manera que la reprogramación de las células somáticas hacia un estado pluripotente pudiera revertir o restablecer los niveles de expresión de la progeria a un estado similar al de los tejidos juveniles(48).

Se han hecho experimentos que muestran que las MSC pueden acumular daño en su DNA, cuando son colocadas en medio de cultivo por largo tiempo, esto podría explicar las modificaciones en su capacidad de diferenciación (incremento de la adipogénesis), sin embargo hay poca evidencia experimental sobre el hecho de que esta acumulación de daños en el DNA pueda tener un efecto significativo *in vivo* (49–51).

Algunos datos experimentales sugieren que las células troncales pueden volver a adquirir ciertas capacidades juveniles para regenerar algunos tejidos mediante cambios en su micro-ambiente. En el caso particular de las células satélite, que son células troncales somáticas propias del musculo estriado esquelético que residen debajo de la lamina basal de las fibro-células.

Con la edad ocurre una disminución de la masa y fuerza muscular conocida con el nombre de sarcopenia que puede deberse a una disminución en el funcionamiento de las células satélite (52).

Cuando existe un daño muscular se produce una respuesta inflamatoria que estimula la proliferación y migración de las células satélite al sitio del daño, al proliferar y diferenciarse se obtienen miocitos maduros que se fusionan para llevar

a cabo la reparación. Este proceso de diferenciación puede controlarse mediante la administración de 5-azacitidina ya que puede aumentar los niveles de metilación del DNA permitiendo la expresión del gen de miogenina. Una demostración de rejuvenecimiento funcional proviene de experimentos de parabiosis heterocrómica (unión quirúrgica del sistema circulatorio de animales jóvenes y viejos), esto implica que factores presentes en la sangre periférica de los animales jóvenes puede restaurar a niveles similares a las células satélite de los animales seniles. Estos datos sugieren que la función disminuida de las células satélite puede no deberse a errores irreversibles como el daño al DNA, si no a cambios epigenéticos reversibles (53,54).

Los efectos del micro-ambiente sobre la función de las células troncales puede tener una explicación alternativa a través del llamado “fenotipo secretor asociado a la senescencia” que se debe a la acumulación progresiva de células seniles dentro de un tejido, lo que provoca modificaciones del micro-ambiente mediante la secreción de algunos factores como es el caso de la interleucina-6; en este caso son dos los factores involucrados, la acumulación de células senescentes y el impacto en la progresión de un fenotipo senil que se refleja en secreciones senescentes, existen datos que señalan que la eliminación de células envejecidas puede prevenir o por lo menos retrasar la disfunción tisular (55).

Algunos trabajos han permitido observar que la acumulación de daño en el DNA, o bien la acumulación de mutaciones en el DNA mitocondrial puede ser un factor importante en las células seniles. En el primer caso se ha observado un aumento gradual y significativo en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), los cuales puedan provocar las mutaciones en el DNA, esto se ha observado cuando se determinan niveles crecientes de ROS en cultivos en serie; la acumulación aparente de daños en el DNA podría probablemente reflejarse en la reducción del telómero de acuerdo con la edad, sin embargo en ratones knockout las telomerasas se acortan más rápido que su contra parte normal. No obstante en la tercera generación los animales muestran telómeros críticamente cortos en células HSC, y se ha relacionado con un envejecimiento hematopoyético prematuro (56). En cuanto a la acumulación de mutaciones en el DNA mitocondrial, existen experimentos en ratones en los que llevan a cabo una corrección de la DNAm polimerasa (DNAm polimerasa mitocondrial) defectuosa y muestran algunas características de envejecimiento prematuro en HSC, sin embargo esto solamente parece restringir la capacidad de diferenciación de algunos tipos celulares, por lo que una función mitocondrial intacta es necesaria para una adecuada diferenciación en algunos tipos de células progenitoras, del mismo modo se ha

argumentado que las mutaciones del DNA mitocondrial por sí mismas son un factor principal de las células troncales somáticas (57).

Durante el envejecimiento también se ha observado un cambio en la polaridad de las HSC que se refiere al hecho de que alguno o todos los organelos se distribuyen asimétricamente; en diversos estudios se sugiere que la polaridad de las HSC regula la división de las células troncales incidiendo en las divisiones celulares para que estas sean simétricas o asimétricas, las células asimétricas muestran una disminución funcional de HSC durante el envejecimiento y puede estar relacionado con una expresión elevada de Cdc42 que parece inducir un tipo de envejecimiento prematuro en ratones: la inhibición farmacológica de Cdc42 parece rejuvenecer la función de las HSC, además de restaurar algunos factores epigenéticos como la distribución espacial de la acetilación de la histona H4 (58,59)

TIPOS DE REPROGRAMACIÓN NUCLEAR

a) DESDIFERENCIACIÓN, TRANSDIFERENCIACIÓN Y REPROGRAMACIÓN

De acuerdo al pasaje epigenético de Waddington (1957)(1), el proceso de diferenciación o especialización es irreversible y unidireccional, sin embargo, a la luz de los últimos descubrimientos ahora se sabe que puede ocurrir la desdiferenciación en la que una célula con aparente diferenciación terminal puede transformarse fenotípicamente en una célula menos especializada, como se dio el caso de células progenitoras, pudiendo entonces diferenciarse en otro tipo celular distinto al original (60). Por ejemplo la conversión de células pancreáticas en células hepáticas que expresan un gran número de enzimas propias de las células hepáticas adultas. También se ha logrado la conversión de células hepáticas en células pancreáticas endocrinas productoras de glucágon, insulina y polipéptido pancreático a partir de células ovoides o células troncales propias del hígado (61).

La transdiferenciación se refiere a la transformación celular de manera directa (sin desdiferenciarse) en otro tipo celular distinto al original, por lo que no se observaran células precursoras ni progenitoras de manera intermediaria (61).

Una de las primeras observaciones de que la transdiferenciación era factible fue realizada en 1987 por Davis *et al* (65), en donde se demostró que fibroblastos embrionarios de ratón se podían transformar en mioblastos mediante la expresión forzada de un regulador maestro del musculo estriado esquelético denominado MyoD. Posteriormente se han logrado otros procesos de transdiferenciación de neuronas (64-66), de células hematopoyéticas (62-69), hepatocitos (68) y células endoteliales (70).

La reprogramación consiste en la transformación de células completamente diferenciadas en células troncales pluripotenciales capaces de originar los 220 tipos celulares del organismo; equivalentes al de células troncales embrionarias. La reprogramación requiere de modificaciones epigenéticas profundas; su conocimiento ha sido uno de los logros en el campo de las células troncales y medicina regenerativa. Figura 1.

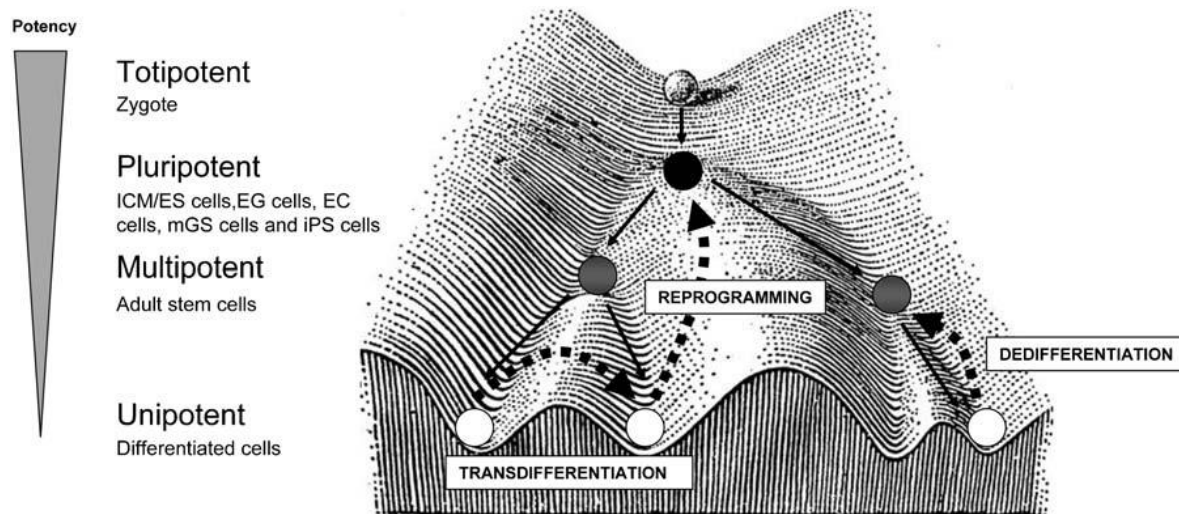


Figura 1. Tomada de : Cristina Eguizabal, Nuria Montserrat, Anna Veiga, Juan Carlos Izpisua Belmonte, PhD1,3 Dedifferentiation, Transdifferentiation, and Reprogramming: Future Directions in Regenerative Medicine Semin Reprod Med 2013;31:82–94 (62)

Otro concepto importante es el de plasticidad, en el cual ocurre una transdiferenciación en un linaje celular no esperado, es decir en un linaje distinto al que correspondería por su estirpe embrionaria; como es el caso de células del mesodermo (MSC), al tejido nervioso, o bien de células del mesodermo a células del endodermo (63).

b) TRANSFERENCIA NUCLEAR DE CÉLULAS SOMÁTICAS (SCNT)

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 inserto un núcleo de células intestinales de ranas adultas (2).

La transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) es conocida como “clonación” y se refiere a transferir el núcleo tomado a partir de una célula somática dentro de un ovocito enucleado y sin fertilizar, después de lo cual el medio ambiente citoplasmático del ovocito es capaz de reprogramar al núcleo transferido y posteriormente activar el desarrollo embrionario. De tal manera que el citoplasma del ovocito tiene las instrucciones necesarias para dirigir la expresión genética del núcleo, pudiendo reprogramarse y comportarse como el núcleo de un ovocito recién fecundado y no como el núcleo de una célula somática diferenciada (64).

La generación de animales por SCNT ha demostrado que puede modificarse el estado epigenético de células somáticas, incluyendo aquellas que están terminalmente diferenciadas, por lo que pueden ser reprogramadas a un estado embrionario capaz de dirigir todo el desarrollo de un nuevo organismo. Dentro de los elementos fundamentales que hacen posible la reprogramación nuclear se encuentran diversos factores de transcripción que se conocen como “factores de reprogramación” presentes en el citoplasma del ovocito, y que son capaces de transformar el epigenoma de una célula somática en una célula embrionaria (65)

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 (66)

c) FUSIÓN CELULAR

La reprogramación del núcleo de células somáticas a un estado indiferenciado puede demostrarse mediante la formación de híbridos producidos por la fusión de células embrionarias con células somáticas. Otros híbridos pueden ser entre

células somáticas y células del carcinoma embrionario, o bien con células germinales embrionarias o células troncales embrionarias; estas fusiones celulares demuestran que el fenotipo pluripotente es dominante en los productos de fusión, es decir, el núcleo diferenciado se reprograma a un estado pluripotente ocasionado por los factores de reprogramación presentes en el citoplasma de la célula más indiferenciada (célula pluripotente) (65).

d) REPROGRAMACIÓN *IN VITRO*: CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS (iPS)

Las ESC derivadas de la masa celular interna del blastocisto son consideradas células pluripotentes debido a que tienen la capacidad de diferenciarse en cualquier linaje celular proveniente de las tres hojas blastodérmicas (ectodermo, mesodermo y endodermo), es decir, pueden originar cualquiera de los 220 diferentes tipos celulares que constituyen un mamífero. El inconveniente de las ESC consiste en que debe destruirse al embrión para poderlas obtener, lo cual tiene implicaciones éticas muy relevantes (4)

En consecuencia, se invirtió mucho esfuerzo en la investigación con el objetivo de generar células humanas pluripotentes a partir 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 (2006). Este estudio en particular fue un gran estímulo para la investigación con células troncales (4)

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 una 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 (5).

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 cambió por completo (67), Ya que este estudio demostró la posibilidad de obtener células pluripotentes de origen humano, sin la necesidad de destruir un embrión, ni realizar la clonación terapéutica dos planteamientos muy cuestionables desde el punto de vista ético.

Posteriormente 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 (5).

Hasta la fecha se han identificado al menos seis estrategias para producir células iPSC: retrovirus, lentivirus, adenovirus, transfección de plásmidos, transposon y proteína recombinante (68).

Las iPSC desde el punto de vista de la medicina regenerativa pueden resolver el problema de la bioética (ya que no es necesario destruir ningún embrión para obtener las células), y la disponibilidad de células para la terapia es ilimitada. A pesar de lo anterior, existe la desventaja del método de obtención de iPSC pues en forma convencional se han utilizado vectores retrovirales que son potencialmente mutagenicos ya que al insertarse los genes puede resultar en el desarrollo de tumores por la posible inactivación de genes supresores de estos, o bien la activación de genes de proliferación celular. Cuando se integran varias copias de genes de reprogramación, se reduce la probabilidad de un silenciamiento aleatorio y se incrementa a su vez la posibilidad de mantener una expresión estable de los transgenes oncogénicos como c-Myc y KFL4 (69).

REPROGRAMACIÓN IN VIVO Y REJUVENECIMIENTO DEL ORGANISMO

a) CONCEPTO DE REJUVENECIMIENTO DEL ORGANISMO

El ser humano, desde épocas inmemoriales, ha tenido el anhelo de la eterna juventud o la inmortalidad, que se materializó entre los alquimistas de la Edad Media a través de la mezcla de diversos compuestos hasta encontrar una pócima

misteriosa, el “elixir de la eterna juventud” (el “elixir de la vida”) que en teoría era capaz de conferir una juventud indefinida a quienes la bebieran. Actualmente la ciencia ha encontrado un mecanismo que puede proporcionar rejuvenecimiento al organismo, este procedimiento es la reprogramación *in vivo*, sin embargo, como muchos avances tecnológicos, esta metodología que reprograma el núcleo de las células somáticas no está exenta de riesgos, como favorecer el desarrollo del cáncer o incluso la inducción a la senescencia (70).

El envejecimiento es un proceso complejo en el que varios mecanismos convergen para generar una acumulación de daño a nivel subcelular, celular e intercelular, además de diversos cambios perjudiciales que se relacionan directamente con la edad del individuo, todo este conjunto de mecanismos y cambios representan el llamado deleterioma o alteraciones deletéreas para el organismo, el cual se incrementa en la medida en que avanza la edad. (71). El factor que parece determinar la edad biológica de un organismo es el incremento en el deleterioma. El deleterioma representa el fenotipo propio del envejecimiento.

La definición de rejuvenecimiento, por otro lado, ha sido motivo de controversia, algunos investigadores lo definen como el tratamiento de algunos fenotipo propios del envejecimiento, otros se refieren al conjunto de intervenciones que tienen como objetivo retrasar el proceso de envejecimiento, sin embargo la definición más adecuada se refiere a los procedimientos o medios para poder trasladar a un organismo de un estado antiguo o senescente a un estado más joven, desde este punto de vista, únicamente el proceso de reprogramación nuclear *in vivo* ha logrado revertir las células ya diferenciadas a un estado embrionario (o indiferenciado), comparado con otras intervenciones o procedimientos en los que no se logra este propósito como son: la restricción calórica, la parabiosis heterocrómica, administración de rapamicina (un inhibidor de la enzima mTOR un sensor celular que regula la síntesis proteica y los niveles nutrimentales y que incrementa el promedio de vida de los ratones) y administración de los llamados senolíticos (72).

En el organismo existen algunas partes incapaces de reprogramación y rejuvenecimiento como son: el tejido muscular cardiaco y estriado esquelético, el tejido nervioso y el cristalino del ojo, Muchas preguntas y retos quedan por resolverse antes de poder implementar una tecnología tan novedosa como desconocida (73).

La reprogramación *in vivo* se perfila como un asunto científico prioritario en medicina regenerativa para incrementar el llamado “periodo de salud”, el tiempo que un individuo es capaz de mantener su homeostasis, considerando que la esperanza de vida del ser humano se ha incrementado al doble en tan sólo 200 años, lo que se ha traducido en el incremento exponencial de la población de edad avanzada. La vejez conlleva al desarrollo de procesos degenerativos, imposibilitación y limitaciones físicas, además de una mayor predisposición a diversas enfermedades entre ellas el cáncer. A nivel celular y tisular la senescencia comprende el daño al ADN, acortamiento de los telómeros, acumulación de agregados tóxicos, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una serie de modificaciones epigenéticas de la cromatina. Todas estas modificaciones celulares y tisulares se traducen en un deterioro fisiológico general o sistémico que desencadena la muerte después de descender por debajo de un nivel crítico para el mantenimiento de la vida. Sin embargo, las alteraciones epigenéticas son por definición reversibles ya que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos del ADN.

b) EPIGENÉTICA DE LA REPROGRAMACIÓN

Con el envejecimiento los patrones epigenéticos de las células se modifican, lo que conduce a una pregunta crucial ¿estas modificaciones representan la base biológica del envejecimiento?

Para tratar de responder esta pregunta se han empleado algunos modelos animales muy interesantes como es el caso de la abeja (*Apis mellifera*) pues las abejas reinas viven mucho más tiempo que las obreras a pesar de compartir el mismo genoma. Si se analiza el epigenoma de cada una, se observa que el patrón de metilación de DAN es distinto, si a las larvas de abejas obreras se les trata con RNAip dirigido a inhibir la acción de una metiltransferasa (Dnmt3), esto conduciría a generar el fenotipo de la abeja reina (Kucharski, Maleszka, Foret, & Maleszka, 2008), este procedimiento exógeno en realidad trata de imitar el proceso natural, ya que las larvas de abejas reina se alimentan con grandes cantidades de jalea real que reduce la actividad de la metiltransferasa Dnmt3, por lo que este control epigenético parece ser clave en el proceso que determina la longevidad de la reina.

Además de la metilación del DNA existen otras “huellas” epigenéticas que deja el envejecimiento como son: la modificación de las histonas y la remodelación de la cromatina (72). Un rasgo comparativo sobresaliente es el hecho de que en los

fibroblastos de un individuo de más de 90 años de edad disminuye la síntesis de las histonas H3 y H4 hasta en un 50% si se comparan con la biosíntesis de un niño de menos de dos lustros de edad (75). Se ha propuesto que la reducción de las histonas y chaperonas es el resultado de un ineficiente control de remodelación de la cromatina generado por una respuesta al daño del DNA producido a su vez por el acortamiento del telómero (72). Las células senescentes se caracterizan por presentar cambios en la remodelación de la cromatina de los telómeros y descondensación de la cromatina en las porciones del centrómero (76).

Se han estudiado cepas endogámicas de ratones con trasplante de glándula pineal de animales jóvenes a viejos en los que se ha logrado un incremento de su expectativa de vida en un 20% (73).

A pesar de lo anterior quedan varios puntos medulares sin resolver como son: no está bien establecida la relación causa-efecto entre la epigenética y el envejecimiento, de tal modo que los marcadores epigenéticos puedan ser también impulsores del envejecimiento; también debe conocerse si la longevidad es afectada directamente por una modificación epigenética, no está esclarecido si debe atribuirse a la maquinaria epigenética por si sola o por cambios que corresponden a la expresión génica (72).

c) ENVEJECIMIENTO IRREVERSIBLE

No todos los órganos dentro del organismo envejecen de la misma manera, tal es el caso de las neuronas que se diferencian de manera completa en etapas del desarrollo embrionario, de manera similar el caso de los cardiomiocitos, los miocitos estriados esqueléticos y las células del cristalino del ojo, así como los dientes de un adulto, de tal manera que cuando hablamos de rejuvenecimiento por reprogramación nuclear, esta no ocurre en los elementos irreversiblemente envejecidos a lo largo de la vida, aunado a esto existen pérdidas de células irremplazables, por lo que el daño acumulado en estos tipos celulares hacen pensar que al envejecer, el organismo entero también lo hace, por lo que el envejecimiento debería ser considerado irreversible a pesar de que algunos elementos celulares reinicien a “cero” su reloj biológico, otros al ser irremplazables envejecen al organismo irremediamente (30).

d) REJUVENECIMIENTO DEL ORGANISMO

La utilización clínica de las iPSCs tiene diversas desventajas y retos como son: la baja eficiencia de derivación de iPSCs del paciente, mutaciones genéticas que se inducen durante el cultivo celular *in vitro*, se requiere un largo tiempo para poder diferenciar las iPSCs, en diferenciarlas en las células deseadas para el paciente, posible rechazo inmune (a pesar de ser un trasplante autólogo) y transformación neoplásica de las células transplantadas; mediante la reprogramación *in vivo* se pueden superar algunos de estos inconvenientes como son las alteraciones genéticas (que se generan en los cultivos *in vitro* a largo plazo) y el rechazo inmune después del trasplante (77). Además también evita el desarrollo del cáncer relacionado con el proceso de dediferenciación ya que el proceso de reprogramación *in vivo* es directo.

Existen reportes que señalan que las células reprogramadas *in vivo* presentan características celulares más maduras en comparación con las células reprogramadas *in vitro*.

La reprogramación *in vivo* ha logrado transformar fibroblastos en miocitos cardiacos que disminuyeron el área del infarto inducido y atenuaron la disfunción cardiaca posteriormente a la ligadura coronaria experimental, también las células exocrinas del páncreas en células β de los islotes, también se ha logrado la reprogramación directa *in vitro* de células gliales (sumamente abundantes) en neuronas que se han tratado de emplear en lesiones cerebrales o de la médula espinal, del mismo modo en el hígado la reprogramación *in vivo* logró reducir la activación de miofibroblastos hepáticos con lo que se redujo la síntesis de colágena y la cirrosis, por lo que aparentemente tiene un potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades hepáticas crónicas (77).

La aplicación *in vitro* de los factores de Yamanaka (OSKM) ha logrado la adquisición de pluripotencia con que se eliminan diversos marcadores del envejecimiento del organismo. La inducción de OSKM a corto tiempo (durante 2 días) alarga la vida útil de los ratones en un modelo de progeria y mejora el fenotipo celular asociado al envejecimiento y en animales envejecidos de manera natural, mejoró la expansión celular de células β en una lesión pancreática, además de la regeneración del músculo estriado esquelético lesionado previamente. Cabe mencionar que la parabiosis heterocrónica (unión de la circulación sanguínea sistémica entre un animal joven y uno viejo) describen también el rejuvenecimiento tisular y la prolongación de la esperanza de vida en ratones con el modelo de progeria como envejecimiento natural (78).Un riesgo

muy importante que debe tomarse en cuenta es que el proceso de reprogramación *in vivo* hacia la pluripotencia comparte diversas propiedades con el desarrollo de las células cancerosas, de tal forma que la terminación prematura de la reprogramación *in vivo* puede incrementar el riesgo de la carcinogénesis o dar lugar al desarrollo de teratomas, la inducción de OSKM por 7 días causó cánceres (independientes de OSKM) que consistieron en células displásicas e indiferenciadas en diversos órganos, las células cancerosas mostraron pérdida de su identidad celular inicial u original y características génicas asociadas a la pluripotencia (77) . La expresión *in vivo* de OSKM también induce de manera simultánea senescencia celular, lo que refleja la complejidad inherente del proceso de reprogramación *in vivo*.

e) REEMPLAZO CELULAR POR REPROGRAMACIÓN *IN VIVO*

De manera clásica la medicina regenerativa está basada en terapias de reemplazo celular mediante el trasplante para poder suplir diversas disfunciones derivadas de la muerte de un grupo de células o bien su deterioro fisiológico o patológico. Las células introducidas pueden modificarse *ex vivo*, a nivel celular o molecular para hacerlas más eficientes (79). La terapia celular es un área de la medicina regenerativa en la que las células troncales tienen un papel preponderante, sin embargo presenta diversos inconvenientes que limitan su utilización.

Desde el descubrimiento de las células troncales en 1961 por Till y McCulloch (79), se visualizó la posibilidad de trasplantar células troncales de la médula ósea para poder corregir diversas patologías hematopoyéticas a partir de la HSC, en la actualidad este descubrimiento ha podido salvar millones de vidas en todo el mundo pues este concepto se ha realizado con bastante éxito para diversas enfermedades hematopoyéticas en las que se ha podido llevar al plano clínico, pero no ha dado buenos resultados en otros campos, en buena medida por problemas de inmunocompatibilidad (68,80).

En el campo del envejecimiento el descubrimiento de las iPSC por Yamanaka en el 2006 hizo pensar a los científicos en la generación de células funcionales rejuvenecidas *in vitro* para realizar terapias de reemplazo de manera autóloga de prácticamente cualquier célula del organismo. Después del descubrimiento de las iPSC se pensó en la capacidad de poder rejuvenecer todos los tipos de células somáticas *in vitro*, que fueran totalmente funcionales y poder hacer terapias a base de reemplazos celulares autólogos, tomando una pequeña biopsia de células del paciente senil, transformarlas primeramente en iPSC y una vez rejuvenecidas

se diferenciaban en las células requeridas por el paciente, sin embargo como ya se ha mencionado las iPSC presentan diversas dificultades como son: diferenciación incompleta, posible reactivación de los transgenes, mutaciones adquiridas en el proceso de reprogramación, inestabilidad genética y cáncer (81). Por tanto, en el trasplante de células derivadas de iPSC se podía observar una heterogeneidad celular y funcionalidad inmadura, además del riesgo de “contaminación” con células no completamente diferenciadas o células con mutaciones acumuladas, es decir con inestabilidad genética que las hacía proclives a desarrollar tumores.

Aunado a lo anterior el procedimiento de trasplante celular presenta obstáculos como son la preparación *in vitro* y retención del injerto, además de la posible invasividad del procedimiento quirúrgico del injerto (82).

La estrategia de trasplante celular podría entonces ser sustituida por un procedimiento de reprogramación *in vivo* para lograr que las células residentes en los diferentes órganos y tejidos del cuerpo rejuvenezcan y sean funcionales. Sin embargo esta reprogramación a un estado celular pluripotente conlleva el riesgo de generar tumores, por lo que la estrategia de inducir una transdiferenciación para evitar que las células se desdiferencien no debe sustituirse y así evitar el estado pluripotente (83).

Una de las primeras evidencias de que la transdiferenciación era posible fue realizada por Davis et. al. en 1987 (84) quienes pudieron reprogramar *in vitro* fibroblastos en mioblastos mediante la expresión forzada de MyoD un gen maestro propio del músculo esquelético.

La transdiferenciación es más fácil de lograrse en células juveniles o cercanas al desarrollo (85) es decir entre tejidos de la misma hoja blastodérmica, pero también se ha reportado entre células distantes del desarrollo, entre diferentes hojas blastodérmicas, como es la conversión de fibroblastos (mesodermo) a hepatocitos (endodermo) (86), o bien de fibroblastos (mesodermo) a neuronas (ectodermo) (87).

La transdiferenciación *in vivo* ha sido también reportada por diversos autores y tejidos (61,81).

Como una alternativa al trasplante celular en órganos se puede inducir la transdiferenciación *in vivo* para tratar de repoblar células perdidas durante el proceso de envejecimiento, lo que contribuiría a tratar de complementar las capacidades regenerativas intrínsecas de cada órgano o tejido. Los órganos con bajo potencial regenerativo desafortunadamente son vitales y comprenden al pulmón, riñón, cerebro, médula espinal y corazón (88), por lo que no es casualidad que los principales esfuerzos de estos mecanismos de reprogramación estén dirigidos a éstos órganos.

Entre los casos de transdiferenciación *in vivo* se encuentran la inducción de cardiomiocitos a partir de fibroblastos cardiacos que conlleva una mejoría de lesiones isquémicas (89), transdiferenciación de astrocitos a neuronas de la médula espinal, de células de la neuroglía en neuronas del cuerpo estriado. Además se incluyen diversos experimentos en los que se ha logrado la transdiferenciación de células de los acini serosos pancreáticos o células α en células β de los islotes pancreáticos, observándose además una mejora de la diabetes (70), a pesar de que el páncreas es considerado como un órgano con alto nivel regenerativo pero bajo nivel de recambio celular (88), es un órgano de gran importancia clínica tanto en animales domésticos como en el humano por la condición degenerativa que implica la diabetes.

f) ESTRATEGIAS ANTI-ENVEJECIMIENTO MEDIANTE REPROGRAMACIÓN *IN VIVO*

Extender la esperanza de vida en buenas condiciones fisiológicas tanto de las personas como de los animales ha sido uno de los objetivos de la medicina desde hace mucho tiempo ya que a lo largo de la historia se ha creado y reforzado un fuerte lazo de amistad y dependencia entre ellos.

La reprogramación *in vivo* de células residentes en un tejido es una alternativa al trasplante celular. La reprogramación a un estado pluripotente conllevaría un

rejuvenecimiento de estas células, sin embargo esta reprogramación está también aunada al riesgo de generar tumores (62,83).

La utilización de SC con candidatos es muy atractivo con fines de estudio antienvjecimiento (91) ya que tienen propiedades antiinflamatorias y antiapoptóticas además de poder promover procesos de regeneración de órganos y tejidos al reemplazar las células muertas por células sanas, además de poder contrarrestar características seniles como la limitación en la multiplicación celular por tener actividad de la enzima telomerasa y la propiedad de autorenovación, diversos tipos de SC se han postulado, entre ellos algunos autores consideran a las SC del tejido adiposo un buen elemento para estos objetivos, debido a su gran cantidad y a su obtención mediante liposucción (92).

La parabiosis heterocrónica (técnica en la cual se une el sistema circulatorio de un animal viejo con el de un joven), es una estrategia que he demostrado poder rejuvenecer varias características de los animales más viejos al revertir la hipertrofia cardíaca relacionada con la edad, además de remodelar la edad de la vasculatura cerebral, activar la proliferación de células madre neurales y mejorar la neurogenesis olfativa (91).

Un aspecto muy importante para tomarse en cuenta es que la reprogramación *in vivo* anula las alteraciones epigenéticas asociadas al envejecimiento. La inducción cíclica a corto plazo por 2 días de OSKM en ratones amortigua o aminora los cambios fenotípicos e histológicos asociados a la senescencia en muchos órganos, además de extender la vida (útil y funcional) de ratones con el modelo de progeria Hutchison-Gilford, esta enfermedad cursa con alteraciones epigenéticas propias del envejecimiento, particularmente a nivel de las histonas de los nucleosomas (93).

En ratones envejecidos naturalmente con este mismo esquema de inducción de OSKM a corto plazo (2 días) promueve la expansión de células β después de lesiones en el páncreas mejorando además la tolerancia a la glucosa (93).

En ratones con lesiones del músculo estriado esquelético la inducción con OSKM aumenta su capacidad regenerativa, como parte de la mejora en el rejuvenecimiento del organismo y prolonga la vida útil (93).

La terminación prematura de la reprogramación inducida *in vivo* por OSKM tiene el enorme inconveniente de poder desarrollar cáncer (94) ya que la reprogramación hacia el estado pluripotente comparte desafortunadamente diversas características de las células cancerosas como son la pérdida de la identidad original de las células somáticas y la adquisición de la autorrenovación, de hecho, en muchos órganos que desarrollan cáncer las células adquieren propiedades típicas de las SC (Stem cells). La expresión a largo plazo de OSKM *in vivo* genera teratomas en diversos órganos en los que además pueden identificarse iPSCs, lo que demuestra que la reprogramación *in vivo* es posible y la expresión simultánea de OSKM *in vivo* puede inducir senescencia celular en lugar de rejuvenecimiento determinada a través del fenotipo secretor asociado a la senescencia (SASP) (95).

PERSPECTIVAS DE LA REPROGRAMACIÓN *IN VIVO* EN LA MEDICINA REGENERATIVA DE PERROS Y GATOS

En un estudio realizado en Estados Unidos, se observó que los perros de raza mixta (criollos) vivieron significativamente más tiempo en comparación con los perros de raza pura, esta diferencia aumentó conforme aumentaba el tamaño del cuerpo, además los perros que presentaron desgaste dental tuvieron más probabilidades de morir antes que aquellos que tenían su dentadura intacta, de igual modo, los perros independientemente de su sexo tenían mayor riesgo de morir si tenían sus gónadas intactas en comparación con los animales a los que se les había practicado la gonadectomía. Todas esas observaciones apoyan la conveniencia de la reproducción mixta, la gonadectomía en machos y hembras, el impacto del tamaño corporal y el cuidado dental (96)

El tamaño corporal de los perros incide en el momento de la muerte de los animales y la aparición de muchas de las enfermedades implicadas con la edad, por ejemplo el cáncer es un padecimiento que se incrementa drásticamente con la edad, sin embargo se presenta más tardíamente en las razas pequeñas a diferencia de las grandes (97,98), lo mismo sucede con la aparición de las cataratas (99).

La obesidad es un riesgo de salud que se incrementa con la edad y aunque existen múltiples causas de obesidad (endocrinológicas, farmacéuticas, metabólicas, genéticas, entre otras), la principal causa es la sobrealimentación, o sea el desbalance entre el consumo de energía a través de los alimentos y el gasto durante el día (100).

La restricción en la dieta incrementa la longevidad en diversas especies animales, entre ellas los perros (101,102), además de alargar la vida de los perros se disminuyó el riesgo de displasia, osteoartritis y un aumento en la tolerancia a la glucosa (103–105), aunque no existieron diferencias en las causas de muerte (105).

Los gatos maduros o de edad media se sitúan entre los 7 a 10 años de edad, los gatos o viejos de 11 a 14 años y los pacientes geriátricos de 15 o más años (106) .

En los gatos viejos las principales condiciones clínicas que requieren atención se pueden clasificar en: a) alteraciones urinarias (insuficiencia renal crónica, hipoplasia renal, deshidratación), b) problemas ortopédicos (como espondilosis lumbar y osteoartritis), c) problemas digestivos (inflamación intestinal, colangitis, constipación, enfermedades dentales y parodontales, lipidosis hepática y pancreatitis), d) Desórdenes endocrinos (diabetes mellitus -DM-, presencia de nódulos tiroideos), e) enfermedades cardiovasculares (hipertensión, cardiomiopatía, placas de amiloide), f) neoplasias y g) problemas oculares (hemorragia retinal, degeneración retinal, desprendimiento de retina, disminución de la visión y ceguera) (106)

En un estudio realizado en Nueva Zelanda (107) en perros (de 12 a un máximo de 17 años de edad) y gatos de (15 a un máximo de 22 años de edad) se observó que entre los perros las enfermedades crónicas más comunes que requirieron eutanasia fueron: enfermedades degenerativas articulares (32%), neoplasias malignas (21%), enfermedades cardiovasculares (12%), mientras que en los gatos: enfermedades cardiovasculares (34%), falla renal (31%), neoplasias malignas (28%) . Del mismo modo, en este estudio (Gates et al.), tanto en gatos (77.3%) como en perros (69.4%) tuvieron más de un signo clínico asociado a una disminución en la calidad de vida como son inapetencia y declinamiento no específico.

En la siguiente tabla se resumen las principales afecciones de perros de edad avanzada, muchos de ellos generados por una condición previa de obesidad (Tabla 1)

Tabla 1 Modificada de (Obesidad de German)(100) .

Enfermedades que se relacionan con la obesidad en animales de compañía	
Anormalidades metabólicas	Hiperlipidemia, dislipidemia, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa, síndrome metabólico, lipidosis hepática.
Endocrinopatías	Hiperadrenocorticismo, hipotiroidismo, diabetes mellitus tipo I y II, insulinoma, hipopituitarismo, lesión hipotalámica.
Problemas ortopédicos	Osteoartritis, fracturas condilares humerales, craneales, ruptura de ligamentos, enfermedad del disco intervertebral.
Enfermedades cardiorespiratorias	Colapso traqueal, parálisis laríngea, obstrucción de vías respiratorias en braquiocefálicos.
Problemas urogenitales	Urolitiasis (oxalato de calcio), distosia, carcinoma de células de transición, incompetencia del mecanismo del esfínter uretral.
Neoplasias	Carcinoma de glándula mamaria.
Alteraciones funcionales	Trastornos articulares, disnea, hipertensión arterial, intolerancia al ejercicio, intolerancia al calor, golpe de calor, debilidad del sistema inmune, riesgo anestésico aumentado, disminución de la esperanza de vida,

En medicina se ha abierto una nueva hipótesis llamada “dividendo de la longevidad” (LD por sus siglas en inglés) que se basa en dos principios fundamentales: el primero consiste en la mejora de los procesos biológicos que impulsan el envejecimiento, con lo cual podremos retrasar la aparición de todos o al menos la mayoría de los trastornos relacionados con la edad, este principio es una visión fisiopatológica del proceso de envejecimiento; el segundo principio es más bien demográfico, ya que se basa en el retraso de la tasa de envejecimiento con lo cual el periodo de debilidad que acompaña el final de la vida podría compactarse o mantenerse en su lugar, en lugar de alargarse, es decir procurar alargar el periodo de vida saludable sin extender el periodo no saludable (108). Sin embargo, hay que señalar que la salud no es sólo retrasar el inicio o la progresión de enfermedades fatales o potencialmente mortales, además se debe procurar reducir diversos factores de riesgo como son: la obesidad, la diabetes mellitus tipo II, problemas y pérdidas de piezas dentales y procurar la castración de los animales en edades tempranas.

Los perros son de las especies más heterogéneas que existen, algunas razas difieren no sólo en “cuando” mueren sino también “por qué “mueren”. Por citar un ejemplo en el caso de los Doberman Pinscher tienen una alta tasa de morbilidad y mortalidad originadas por cardiomiopatías (109) (102). En estudios recientes se ha observado que la pérdida de la visión, audición, dolor articular y la debilidad muscular (por sarcopenia) son comunes en los perros seniles. Esto indica que retrasar la aparición del cáncer, enfermedades cardíacas y metabólicas como la diabetes (111), el dolor de las articulaciones, así como mantener la funcionalidad sensorial y la movilidad podría ser una estrategia exitosa como lo ha sido en la especie humana (108).

La causa más común de muerte en perros es el cáncer, sin embargo si se eliminaran todas las muertes causadas por cáncer, el aumento de la vida útil de estos animales es modesto, pero si ralentizamos el proceso de envejecimiento en un 10% (que es poco comparado con lo que ya se ha logrado en otras especies como moscas, ratones o gusanos) se lograría un incremento similar de la vida útil de los perros (108).

También hay que considerar que las razas pequeñas al vivir más también desarrollan un mayor número de enfermedades relacionadas con la enfermedad en relación con las razas grandes, por lo que prolongar el “potencial de longevidad podría traer como consecuencia el incremento de algunas enfermedades, incluso

desde el principio de la vida (98). Lo anterior supone que el proceso de intervención con la finalidad de alargar la vida útil de los animales debe ser en el momento más oportuno para lograr el mejor efecto posible en estos procesos complejos en las diferentes razas, con la finalidad de reducir de manera efectiva las enfermedades y debilidades de la vida temprana y tardía de estos animales (108).

Los órganos claves del proceso de rejuvenecimiento que han sido estudiados en ratones y que pueden tener utilidad en perros y gatos son principalmente: el músculo cardíaco, el músculo estriado esquelético, el tejido nervioso, el páncreas, hígado y la retina del ojo (además de otros órganos sensoriales) (111).

La reprogramación parcial cíclica (91) demostró que pueden borrarse algunas marcas de envejecimiento epigenético, pero evita las marcas de diferenciación celular y aunque logró un incremento del 50% en el tiempo medio de supervivencia en relación con los controles (progeroides) si se interrumpe el tratamiento de reprogramación, los signos de envejecimiento regresan y en general a lo largo del tratamiento algunos rasgos de envejecimiento permanecieron sin cambio. Este proceso indujo la proliferación de células satélites en el músculo estriado esquelético y células β del páncreas, haciéndolas más resistentes a lesiones y a mejorar su capacidad de regeneración tisular, en ratones con modelo de progeria en los que estas células (al igual que en individuos seniles) disminuye su número por lo que se puede inferir que este procedimiento podría tener efectos benéficos clínicos, más allá del proceso de rejuvenecimiento integral del organismo del ratón. Por lo anterior se piensa que de manera inicial la reprogramación parcial cíclica podría aplicarse de manera preventiva a pacientes proclives a presentar alteraciones orgánicas predecibles y así evitar factores de riesgo y reducir quizás de manera significativa su tasa de envejecimiento (30). En etapas posteriores se podría intentar el rejuvenecimiento progresivo de individuos seniles mediante la reprogramación parcial cíclica (30). Un punto fundamental sería lograr que la inducción de reprogramación no requiriera continuos tratamientos para evitar que la reprogramación desapareciera una vez que los tratamientos se suspenden (91).

a) REJUVENECIMIENTO DE CARDIOMIOCITOS

En animales adultos los cardiomiocitos pierden su capacidad de proliferación celular, haciendo este órgano vital muy vulnerable, Las lesiones más comunes son los infartos al miocardio que ocasionan muerte celular masiva,

acompañándose de fibrosis del área lesionada, y su incapacidad permanente de regeneración tisular (112). La cicatriz cardiaca o el tejido fibrótico formado en el proceso de reparación no presentan contracción cardiaca lo que demerita el funcionamiento normal del órgano, por lo que el infarto constituye según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la principal causa de muerte del ser humano en el mundo. En medicina veterinaria de perros y gatos, las principales afecciones cardiacas corresponden a: regurgitación mitral, enfermedades pericárdicas y diversas cardiomiopatías de caninos y felinos (113).

En todo caso una de las principales estrategias terapéuticas en el proceso de rejuvenecimiento es buscar la transdiferenciación de fibroblastos en cardiomiocitos funcionales, ya que la tasa de renovación de los cardiomiocitos es muy baja en los mamíferos adultos y más aún en los animales envejecidos (70). La transdiferenciación de fibroblastos a cardiomiocitos (por conversión directa y sin procesos de desdiferenciación) se ha logrado tanto *in vitro* (114) como *in vivo* (89). Esta conversión se logró mediante la expresión forzada de 3 factores de transcripción que especifican el linaje cardiaco: Gata4, Mef2 y Tbx5 (GMT, de acuerdo a sus iniciales). Las células similares a cardiomiocitos, mostraron marcadores, perfiles epigenéticos y expresión génica propios de los cardiomiocitos y desde el punto de vista funcional, además a pesar de que inicialmente las células reprogramadas *in vitro* mostraron contracción en un bajo porcentaje, una vez que en los ratones se realizó un ensayo de infarto, las células trasplantadas un día después de la maduración espontánea exhibieron contracción espontánea (114). En experimentos *in vivo* demostraron que la presencia de señales en el microambiente tisular del corazón favorece la reprogramación, siendo aparentemente más eficiente que la reprogramación *in vitro*. La expresión directa de GMT en el modelo de ratones infartados fue capaz de transdiferenciar fibroblastos residentes del corazón en cardiomiocitos funcionales, pues se observó acoplamiento eléctrico, además de responder a estímulos eléctricos (89). De estos trabajos se puede concluir que los fibroblastos cardiacos pueden ser reprogramados en cardiomiocitos *in vivo*, además de que el micromambiente del corazón favorece la reprogramación y su integración fisiológica en el órgano.

Diversos investigadores utilizando este modelo murino han logrado incrementar la eficiencia de la reprogramación *in vivo* añadiendo al coctel original (GMT) el factor de transcripción propio del linaje cardiaco, Hand2 (GHMT) (115)..Mediante la utilización de miRNAs propios del tejido cardiaco como miRNA 1, 33 208 y 499 administrados *in situ* a corazones murinos infartados eran suficientes para promover la reprogramación de fibroblastos en cardiomiocitos (116), lo que abre

enormes posibilidades clínicas por la facilidad de administrar miRNAs en lugar de factores de transcripción, convirtiéndolos en atractivas herramientas terapéuticas para un futuro.

b) REJUVENECIMIENTO DE NEURONAS

El nicho de las células troncales neurales se ubica en las regiones subventriculares y región subgranular del giro dentado del hipocampo (117). Estas regiones en los seres humanos tienen gran plasticidad y capacidad de migración celular para poderse diferenciar en linajes nerviosos (118).

Los esfuerzos en medicina regenerativa se han concentrado en la diferenciación de células de la neuroglía en neuronas, debido a que presentan algunas características de células progenitoras y además son las células más abundantes en el sistema nervioso central, particularmente en el cerebro de animales adultos (119), lo que las hace muy atractivas para los procesos regenerativos *in situ*. Estos procesos de transdiferenciación se han intentado mediante la utilización de factores de transcripción ectópicos únicos antes que la utilización de un grupo de ellos, así se ha utilizado el factor Sox2 en la corteza cerebral para inducir células con características a neuronas a partir de astrocitos, o bien usando este mismo factor de transcripción a partir de células de la glía NG2, esto pudo lograrse cuando existían lesiones focales, lo que refuerza la idea de que la reprogramación celular se ve favorecida cuando están asociadas repuestas inflamatorias o daño tisular (120). En experimentos *in vitro* pericitos de la corteza cerebral del ratón se han podido diferenciar en neuronas por medio de SOx2 y una proteína que interviene como especificador neuronal Mash1, las células nerviosas obtenidas presentan potenciales de acción, lo que abre la posibilidad de utilizar en un futuro de manera clínica a los pericitos (121).

En cuanto a las enfermedades neurodegenerativas, en un modelo murino para estudiar la enfermedad de Alzheimer, el factor de transcripción NeuroD1, células gliales fueron reprogramadas a neuronas glutaminérgicas provenientes de astrocitos y células glía NG2, y neuronas GABAérgicas a partir de glía NG2 (122). Para el caso de la enfermedad de Parkinson, se han podido inducir *in vivo* neuronas dopaminérgicas a partir de astrocitos del cuerpo estriado (123), estas neuronas mejoran los signos motores característicos de la enfermedad demostrado en un modelo murino de la enfermedad de Parkinson, esta transdiferenciación a partir de astrocitos humanos ha sido demostrada *in vitro*

generando con ellos expectativas para su posible utilización terapéutica a futuro (70).

En el campo de la senectud, las estrategias de reprogramación *in vivo* tendrían como objetivo tratar de revertir la degeneración neuronal originada por la edad o bien para incrementar la capacidad regenerativa endógena de los pacientes (70).

c) REJUVENECIMIENTO DE CÉLULAS β PANCREATICAS

En perros la diabetes es una enfermedad endocrina bastante común y de origen espontáneo, en la que existe deficiencia en la secreción de insulina debida a la pérdida de las células β , la causa no se conoce con claridad, pese a sus semejanzas con la diabetes mellitus tipo I de los humanos; la causa autoinmune, como ocurre en los humanos, es todavía muy controvertida (124).

En comparación con la presentación de la diabetes mellitus en humanos, en los perros también hay hiperglucemia, atrofia de los islotes pancreáticos, mientras en humanos se presenta en personas menores de edad (menos de 18 años) en los perros puede presentarse desde una edad media (8 años) hasta animales seniles, en ambos casos la terapia es a base de insulina y las principales complicaciones de la enfermedad en perros corresponde a problemas oculares como cataratas, retinopatía , además de cetoacidosis diabética (DKA) (111). Existen estudios que demuestran que una décima parte de los perros diagnosticados con diabetes son sacrificados en ese momento y otra décima parte en el transcurso de un año con la enfermedad (125).

El tratamiento de la enfermedad es fundamentalmente sintomático pero no curativo, la medicina regenerativa ha buscado diversas estrategias para tratar de curar a estos pacientes, el fundamento de todas ellas es proporcionar células β funcionales que induzcan la normoglucemia de manera fisiológica y permanente para no requerir el tratamiento a base de insulina (126).

Una estrategia es el trasplante del páncreas, sin embargo presenta diversos inconvenientes, entre los que destacan el rechazo agudo, la infección por cytomegalovirus y complicaciones postquirúrgicas. Sin embargo se ha visto que con la ayuda de inmunosupresores del 60 al 80% de los pacientes transplantados han vivido sin requerir insulina durante 10 años (127). El trasplante de islotes

pancreáticos en humanos, es un procedimiento menos invasivo que ha logrado evitar el uso de insulina induciendo normoglucemia hasta por 5 años después del trasplante (128). Sin embargo, este procedimiento tampoco está exento de dificultades como lo es la trombosis de la vena porta, esteatosis hepática, hemorragias, úlceras orales inducidas por el tratamiento con inmunosupresores, entre otros (128), de hecho la utilización de estos medicamentos son factores que limitan el uso de ambos procedimientos de trasplante. Se han diseñado procedimientos de aislamiento de islotes pancreáticos en perros y se han desarrollado procedimientos de encapsulamiento de islotes en perros y ratones para conocer su biocompatibilidad y eficiencia a largo plazo en estos modelos animales (129)

Queda aún mucho por investigar para poder realizar aloinjertos ya sea de órganos completos como de islotes aislados en perros.

Otra estrategia sería lograr la reprogramación *in vivo*, no necesariamente de todo el organismo, sino de manera específica del páncreas o de órganos que puedan sustituir en parte la actividad endocrina del páncreas.

En 2008 Zhou y colaboradores lograron la transdiferenciación de células exocrinas del páncreas (acinis serosos) en células endocrinas β *in vivo* (126) productoras de insulina en ratones, mediante la expresión forzada de tres factores de transcripción (MafA, Neurog3 y Pdx), este tipo de reprogramación consiste en un atajo para evitar los procesos de desdiferenciación y posterior reprogramación específica. Las células β reprogramadas son funcionales pues lograron disminuir la hiperglucemia de los animales, además de que las células se agruparon recordando los islotes de Langerhans o islotes pancreáticos característicos de la porción endocrina del páncreas (126).

También en roedores puede lograrse la transdiferenciación de células α en β mediante la expresión de Pax4 que es un gen característico de células β (130) o bien mediante la inactivación del gen Arx que es característico de las células α (131). Las células de los conductos pancreáticos de ratones adultos pueden convertirse en células α , β o γ mediante la inactivación del gen Fbw7 que es un sustrato de la enzima ubiquitina ligasa (SCF), con lo que estas células de los conductos se pueden reprogramar en células propias de la porción endocrina del páncreas (132).

En estos procesos de reprogramación *in vivo* es deseable que no se utilicen intervenciones genéticas o el uso de transgenes, por los riesgos inherentes, en este sentido se han podido utilizar factores de crecimiento o citocinas, como el factor de crecimiento epidermal y el factor neutrófico ciliar con fines de reprogramación exitosa en un modelo de hiperglucemia crónica en murinos, con lo que las células exocrinas (acini) se transdiferencian en células β propias de los islotes de Langerhans. Otro mecanismo de reprogramación consiste en la reprogramación epigenética de las células en las que se reactiva Neurog3, una proteína requerida para el establecimiento del estado endocrino durante el desarrollo pancreático (133).

La medicina regenerativa también ha considerado otra estrategia muy interesante que consiste en generar células β del páncreas en órganos extrapancreáticos, pero que tienen en común un mismo origen endodérmico; como son los hepatocitos, vesícula biliar y células intestinales. En el caso del intestino, las células progenitoras enteroendocrinas presentes en las criptas o glándulas intestinales expresan Neurog3 (neurogenina 3) (134). La expresión de insulina y otros marcadores propios de las células β por estas células se logra mediante la inactivación de Foxo1, lo que posiblemente indica que la expresión de esta proteína evita esta transdiferenciación en el intestino, aunque este proceso es parcial, pues las células conservan algunas características intestinales (135) . Más recientemente se ha logrado la transdiferenciación completa mediante la expresión forzada de Neurog3 además de Pdx1 y MafA (136) .

Estos hallazgos tienen gran importancia clínica debido a que dada la longitud del intestino implica la presencia de un gran número de células enteroendocrinas con un potencial terapéutico para poderse emplear con esta finalidad.

RETOS E INCONVENIENTES DE LA REPROGRAMACIÓN *IN VIVO*

Por lo expuesto en este trabajo debemos considerar que el proceso de rejuvenecimiento quizás no sea la única o la más adecuada estrategia para incrementar la vida útil de perros y gatos y se requiere mucha investigación básica y clínica que nos ayude a comprender todas las variables y circunstancias presentes a lo largo de la vida y conocer a fondo el proceso biológico del envejecimiento que nos permita tomar decisiones sobre la forma y el momento de

intervenir en el proceso de envejecimiento para poder alargar la vida útil de los animales.

Uno de los principales retos del proceso de rejuvenecimiento es conocer su efecto favorable en la primera causa de muerte en lo perros y gatos viejos que es el cáncer, sin considerar el riesgo de desarrollar tumores que implica el proceso de reprogramación nuclear *in vivo* (e *in vitro* en un proceso de reprogramación incompleta), este es sin duda uno de los principales retos fisiopatológicos de la medicina para poder hacer realidad la extensión de la vida.

El proceso de reprogramación *in vivo* hacia la pluripotencia origina la pérdida de la identidad celular original, adquisición de autorrenovación, que son características que comparten muchas células cancerosas (93). Debido a que las modificaciones de la reprogramación son epigenéticas, puede abrirse un enorme campo de investigación para conocer las modificaciones epigenéticas que llevan a las células somáticas a desarrollar el cáncer (93). La expresión de OSKM a largo plazo generó teratomas con la presencia de iPSCs en diversos órganos, lo que demuestra el peligro de convertir células somáticas en iPSCs por reprogramación *in vivo* de manera descontrolada; sin embargo si se hace a corto plazo (3- días) se pueden generar lesiones displásicas reversibles en órganos como intestino, hígado y páncreas, pero si se dejan por 1 semana se pueden desarrollar cánceres irreversibles por células indiferenciadas en múltiples órganos, entre ellos el riñón, estas células cancerosas pierden su identidad original y adquieren marcadores genéticos propios de células pluripotentes (94). Además muestran hipermetilación del DNA, que se han identificado como responsables del desarrollo del tumor.

De los 220 tipos celulares distintos sólo se ha sometido a experimentación de reprogramación *in vivo* un pequeño número de ellos en las especies correspondientes (perros y gatos) ya que hasta ahora la principal especie de experimentación son los ratones (70).

Deberá estudiarse de manera específica la fuente celular a reprogramar ya que al reprogramar a las células y transdiferenciarlas podría perderse su función, uno de los mejores candidatos (y mejor conocidos) son los fibroblastos, ya que tienen alto potencial proliferativo lo que la población reprogramada podría reponer fácilmente por nuevos fibroblastos, además son muy comunes en múltiples órganos y cumplen funciones de apoyo estructural y funcional de los órganos, sin embargo

hace falta más experimentación ya que en el cuerpo existen diversos tipos de fibroblastos y sus respuestas podrían variar grandemente (70).

Aunque a diferencia de la reprogramación *in vitro*, la reprogramación *in vivo* parece favorecer el proceso de maduración funcional de las células inducidas por el microambiente tisular (ausente en el medio del cultivo *in vitro*), debe garantizarse la funcionalidad efectiva de las células inducidas en los distintos órganos (137).

Un reto del proceso de reprogramación *in vivo*, será evitar el riesgo de la reprogramación ectópica (reprogramación de tipos celulares no deseados en un tejido u órgano), pues el proceso requiere de altos niveles de reprogramación génica ectópica, sin embargo hasta ahora no existen reportes en este sentido, quizás porque se han utilizado bajos niveles de factores de transcripción (119).

Otra barrera que deberá vencerse es la integración funcional de las células inducidas en los órganos o tejidos, esta es particularmente complicada considerando que en un individuo viejo existe un microambiente “enfermo” o decadente en el que posiblemente se han llevado a cabo eventos de reparación que generalmente ocasionan la presencia de tejido cicatricial. Particularmente relevante es el caso del corazón, en el que se requerirá reprogramar un mayor número de células que los modelos murinos, con el riesgo potencial de efectos detrimentales o adversos en este proceso. (119). Para tratar de contrarrestar esto se puede llevar a cabo la extirpación quirúrgica del áreas lesionada o acondicionar el tejido mediante el uso de metaloproteinasas que remodelan la matriz extracelular favoreciendo un enfoque reconstructivo en el que las células trasplantadas y reprogramadas vayan a poblar estas áreas acondicionadas o extirpadas (138–140) favoreciendo su integración fisiológica *in situ*. Este proceso de integración puede favorecerse mediante el trasplante de andamios biodegradables que traten de imitar la matriz extracelular propia del órgano o tejido en el área extirpada (141), de tal forma que mientras el andamio se degrada de manera paulatina las células reprogramadas e injertadas producen su propia matriz extracelular de manera natural.

En diversos estudios principalmente en roedores se ha demostrado la ventaja de reprogramación *in vivo* sobre la reprogramación *in vitro*, particularmente en un entorno tisular de lesiones. Sin embargo la experiencia con otros avances biotecnológicos como la terapia génica (en la que se experimentó incluso con

primates no humanos) dejó claro la importancia de los ensayos clínicos, pues algunos resultaron fatales en humanos, de tal manera que será indispensable saber la respuesta particular de los perros y gatos a esta nueva tecnología, pues las respuestas en caninos y felinos pueden ser muy distintas a las observadas en modelos animales murinos (70). Debe tomarse en cuenta que podrían también existir diferencias intrínsecas o propias en las células entre las diferentes especies, por ejemplo los factores inductores que funcionan en una especie (por ejemplo cardiomiocitos diferenciados a partir de fibroblastos murinos) podrían no ser tan efectivos o requerir de ciertos ajustes en otras especies (por ejemplo entre roedores y perros o gatos) (70).

De acuerdo con diversos datos científicos los factores de reprogramación OSKM parecen ser universales pues se han demostrado en especies muy alejadas filogenéticamente como son las ranas, moscas, peses, aves y mamíferos (142–145). Por lo que los procesos de estos factores “universales” o pequeñas moléculas análogas pueden ser útiles en los procesos de reprogramación *in vivo*. El problema de la administración de estos factores inductivos podrá ser el objetivo de diversos estudios aunque es probable que con los avances de la nanoingeniería y la terapia génica puedan ser superados en un futuro razonable (146,147).

La plasticidad celular (que deberá demostrarse científicamente de manera cabal) también es un fenómeno biológico que debe tenerse en mente, ya que por un lado se relaciona con una alta capacidad regenerativa, pero por el otro se relaciona con la tumorigénesis, lo que se ha demostrado por la expresión a largo plazo de los factores inductivos *in vivo* y la formación de teratomas en el ratón, es decir, la expresión descontrolada de OSKM puede tener efectos muy desfavorables (70). El grado de inducción conlleva un incremento proporcional en el grado de plasticidad, así una inducción por 8 días induce la formación de teratomas, la expresión por 4-7 días origina displasias propias de cada tejido, mientras que la expresión por 2 días es insuficiente en el proceso de rejuvenecimiento epigenético sin formación de las neoplasias (109). Además de los factores de Yamanaka (OSKM) podrían emplearse (según el órgano o tejido) especificadores de linaje para provocar la rediferenciación (o transdiferenciación) directa de las células progenitoras inducidas (70).

Antes de la aplicación clínica de la reprogramación *in vivo*, debemos conocer diversos mecanismos moleculares subyacentes en el proceso, como son: a)

¿Cómo se altera el pasaje epigenético durante la reprogramación?, b) ¿Cuáles son las rutas moleculares y de señalización intracelular e intercelular que se activan y cuales se reprimen? Para conocer posibles factores de riesgo de utilizar esta tecnología, c) ¿Qué circuitos genéticos pueden activarlo o antagonizarlo independientemente del tipo celular? Que pudieran permitir predecir el resultado de reprogramación en células de cada una de las cuatro hojas blastodérmicas. d) ¿cuáles son los diferentes marcadores moleculares para identificar los diferentes estados plásticos de las células en los procesos de reprogramación? Que permitan identificar posibles riesgos de activación de oncogenes para aspirar a realizar estrategias de reprogramación más robustas, seguras y eficientes (70).

Los estudios más recientes se han llevado a cabo utilizando los factores OSKM en ratones en modelos de progeria y con lesiones agudas en órganos como el páncreas y el músculo, por lo que debemos conocer si realmente el proceso de reprogramación *in vivo*, es capaz de extender realmente y de manera eficaz la vida útil de los animales de laboratorio (o testigos) y si es capaz de hacerlo en perros y gatos. También deben descubrirse los mecanismos que producen las mejoras histológicas observadas en los órganos estudiados (páncreas y músculo), o si este mecanismo de reprogramación puede ser útil o por lo contrario riesgoso en otros órganos o modelos animales (70).

La estrategia de reprogramación por OSKM contempla la utilización de retrovirus, y oncogenes (M y K) que vuelven el procedimiento inseguro y propenso al desarrollo de tumorigénesis. Para poder superar estos inconvenientes, pueden emplearse virus adenoasociados que no se integran al genoma y presentan baja inmunogenicidad como ventajas (77).

Investigaciones recientes (148–150) permiten predecir que en un futuro puedan emplearse moléculas pequeñas en los procesos de reprogramación que complementen o incluso sustituyan a OSKM, sin embargo debe tomarse en cuenta que la reprogramación *in vivo* es un proceso complejo y de múltiples pasos por lo que además de conocerlo y optimizarlo debe darse un enfoque completamente químico en el futuro (77).

No debe perderse de vista que el proceso de reprogramación *in vivo* depende en buena medida del microambiente tisular (células circundantes y señales intercelulares, así como el tejido conjuntivo específico del órgano en particular), por lo que deben conocerse los mecanismos autónomos no celulares de la

expresión de los factores de reprogramación en los mamíferos y en particular en los carnívoros de interés (perros y gatos) para hacer los procesos más confiables y específicos (77).

Todos estos estudios previos a la utilización clínica de la reprogramación *in vivo*, probablemente conduzcan a estrategias terapéuticas más seguras que puedan sustituir terapias de reemplazo, injertos o trasplantes invasivos por mecanismo de rejuvenecimiento y autocuración que conduzcan a una regeneración eficiente y fisiológica o a mecanismos de rejuvenecimiento que extiendan la vida útil de los perros y gatos.

CONCLUSIONES

Para su posible aplicación en un futuro la reprogramación *in vivo* con fines de rejuvenecimiento, estrategia de antienvjecimiento y regeneración tisular, debe vencer diversos obstáculos y retos. La utilización de vectores de virus adenoasociados puede garantizar una mayor seguridad pues muestran baja inmunogenicidad, además de no mostrar integración en el genoma. Es conveniente buscar en el proceso de reprogramación *in vivo* métodos lo menos invasivos posibles, una posible estrategia es la utilización de productos químicos, sin embargo el proceso es complicado y requiere de múltiples pasos, otra opción es buscar moléculas pequeñas que eliminen las barreras epigenéticas propias de un tipo celular diferenciado que pudiera conducir a una mayor eficiencia de la reprogramación. Otra estrategia pudiera ser la utilización de programas de predicción computacional acerca de los factores de reprogramación para la conversión eficiente del destino celular, lo mismo podrá utilizarse el análisis unicelular a lo largo del proceso de reprogramación con el objetivo de procurar mejorar la calidad y eficiencia del proceso (77).

La expresión de los factores en los organismos multicelulares permitirá relevar los efectos autónomos NO celulares, a este respecto se ha descubierto un papel relevante de la senescencia en la plasticidad celular en los tejidos, lo que sugiere que la utilización de OSKM incrementa la plasticidad celular, la cual se asocia a un mayor potencial de regeneración tisular.

En relación con el estudio del desarrollo embrionario normal del organismo la reprogramación *in vivo* puede proporcionar valiosa información sobre los fenómenos biológicos vinculados con la senescencia ya que esta forma parte del crecimiento embrionario normal de los mamífero (77).

El perro y el gato representan un modelo biológico muy relevante para el estudio de la vejez, ya que comparten con el ser humano diversas afecciones y enfermedades relacionadas con la edad avanzada como son: obesidad, diabetes, falla cardiaca congestiva, enfermedades autoinmunes, catarata, enfermedades renales y hepáticas, enfermedades neurodegenerativas, sarcopenia, enfermedades articulares y cáncer (98,99,108,151,152).

En el plano practico, la mayor factibilidad de aplicaciones en la clínica de perros y gatos se encuentran las siguientes intervenciones:

Se han realizado experimentos que demuestran que puede generarse el rejuvenecimiento de ciertos tejidos en el perro, como es el ligamento periodontal de los dientes, lo cual es muy relevante en la clínica de perros y gatos (153).

La utilización de fármacos que extienden la esperanza de vida ha sido utilizada en ´perros, particularmente la rapamicina, que puede extender la vida de los perros hasta la mitad del promedio de vida normal (154), además de también ser capaz de restaurar la función del sistema inmune. Otro candidato para tener efectos de rejuvenecimiento es la metformina que actualmente se utiliza para controlar la diabetes, la metformina (y la rapamicina inhiben la mTOR y otros efectos relacionados con la senescencia (154).

En enfermedades hepáticas de perros y gatos, como son la hepatitis aguda y crónica, la hepatitis disecante lobular canina (exclusiva del perro), hígado graso, cirrosis y enfermedades biliares, dado que se ha estudiado la aplicación de células troncales (células ovas) y progenitoras hepáticas, es factible pensar en posibles procesos de rejuvenecimiento hepático (71).

El ser humano desde el inicio de los tiempos ha temido a la muerte, de ahí la creación de la religión que le da cierta paz, cierta tranquilidad y la esperanza de una vida eterna donde no hay dolor emocional ni físico. En la historia encontramos varios ejemplos relacionados a la búsqueda de la eterna juventud, por ejemplo los alquimistas de la edad media los cuales formulaban pócimas mágicas y hechizos que les ayudaran a alcanzar la tan anhelada juventud, pero, a pesar de los avances en la ciencia y tecnología, el hombre no ha podido aun encontrar la manera de permanecer joven por mas tiempo, o simplemente evitar el desarrollo de enfermedades.

Cada día, alrededor del mundo se llevan a cabo decenas de experimentos tratando de encontrar la fórmula del rejuvenecimiento, la que nos permita alcanzar el sueño que desde siempre ha estado en la mente del ser humano; desafortunadamente dentro de esas pruebas que arrojan alguna esperanza, también se observan situaciones que pueden poner en peligro la vida.

Desde siempre los seres humanos también han estado ligados a sus animales, por trabajo, alimento o compañía, por lo que hoy en día se piensa en buscar métodos o tratamientos que también alarguen su vida.

Los estudios con animales de compañía (perros y gatos), podrían además abrir nuevos caminos en la medicina regenerativa, además de mayor comprensión de la complejidad de las enfermedades, así como de las funciones moleculares, y con ello generar terapias que puedan brindarle al ser humano mayores esperanzas de recuperación.

Un seguimiento desde el inicio hasta la total recuperación de las enfermedades de perros y gatos, ayudará de igual manera a los pacientes y que se avance en la medicina regenerativa.

Desafortunadamente en México no se ha logrado superar la frontera que nos separa de los estudios e investigaciones teóricas de las prácticas, lo que nos aleja más de llegar a una meta específica, a un resultado concreto, que en este caso sería alcanzar mejores condiciones de salud y vida.

Aunque ya existen informes sobre la generación de iPSC a partir de perros y gatos muy prometedores tanto para medicina veterinaria como humana, las condiciones óptimas para reprogramar células somáticas de las diferentes especies y mantener su estado de pluripotencia, aún estamos lejos de entenderlas y usarlas en la clínica, sin embargo hemos comenzado a recorrer el camino.

REFERENCIAS

1. Waddington CH. The strategy of the genes; a discussion of some aspects of theoretical biology. London: Allen & Unwin; 1957.

2. Gurdon JB. The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. *Development*. 1 de diciembre de 1962;10(4):622-40.
3. Gurdon JB, Wilmut I. Nuclear transfer to eggs and oocytes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 1 de junio de 2011;3(6).
4. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 25 de agosto de 2006;126(4):663-76.
5. Anzaldúa Arce Santiago R, Juárez Mosqueda ML VGH, Rios- Mas Cristina, Cornejo, Cortés MA, Meras-Rios Marco Antonio. What are stemcells or «mother cells»? *Vet-Mex*. 2017;1(38):81-104.
6. Srivastava D, DeWitt N. In Vivo Cellular Reprogramming: The Next Generation. *Cell*. 8 de septiembre de 2016;166(6):1386-96.
7. López-León M, Goya RG. The Emerging View of Aging as a Reversible Epigenetic Process. *Gerontology*. 2017;63(5):426-31.
8. Taguchi J, Yamada Y. In vivo reprogramming for tissue regeneration and organismal rejuvenation. *Curr Opin Genet Dev*. octubre de 2017;46:132-40.
9. 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*. 17 de 2018;9(1):349.
10. Galkin F, Zhang B, Dmitriev SE, Gladyshev VN. Reversibility of irreversible aging. *Ageing Res Rev*. 2019;49:104-14.
11. Beyret E, Martinez Redondo P, Platero Luengo A, Izpisua Belmonte JC. Elixir of Life: Thwarting Aging With Regenerative Reprogramming. *Circ Res*. 05 de 2018;122(1):128-41.
12. Sogabe Y, Seno H, Yamamoto T, Yamada Y. Unveiling epigenetic regulation in cancer, aging, and rejuvenation with in vivo reprogramming technology. *Cancer Sci*. septiembre de 2018;109(9):2641-50.
13. Mosteiro L, Pantoja C, Alcazar N, Marión RM, Chondronasiou D, Rovira M, et al. Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science*. 25 de 2016;354(6315).
14. Chiche A, Le Roux I, von Joest M, Sakai H, Aguin SB, Cazin C, et al. Injury-Induced Senescence Enables In Vivo Reprogramming in Skeletal Muscle. *Cell Stem Cell*. 02 de 2017;20(3):407-414.e4.

15. Ocampo A, Reddy P, Martinez-Redondo P, Platero-Luengo A, Hatanaka F, Hishida T, et al. In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell*. 15 de diciembre de 2016;167(7):1719-1733.e12.
16. Pareja-Galeano H, Sanchis-Gomar F, Pérez LM, Emanuele E, Lucia A, Gálvez BG, et al. iPSCs-based anti-aging therapies: Recent discoveries and future challenges. *Ageing Res Rev*. mayo de 2016;27:37-41.
17. Armstrong L, Al-Aama J, Stojkovic M, Lako M. Concise review: the epigenetic contribution to stem cell ageing: can we rejuvenate our older cells? *Stem Cells Dayt Ohio*. septiembre de 2014;32(9):2291-8.
18. Chen J-H, Yip CYY, Sone ED, Simmons CA. Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential. *Am J Pathol*. marzo de 2009;174(3):1109-19.
19. Hatoya S, Torii R, Kondo Y, Okuno T, Kobayashi K, Wijewardana V, et al. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells from canine blastocysts. *Mol Reprod Dev*. marzo de 2006;73(3):298-305.
20. Vaags AK, Rosic-Kablar S, Gartley CJ, Zheng YZ, Chesney A, Villagómez DAF, et al. Derivation and characterization of canine embryonic stem cell lines with in vitro and in vivo differentiation potential. *Stem Cells Dayt Ohio*. febrero de 2009;27(2):329-40.
21. 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*. enero de 2010;77(1):2.
22. 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.
23. Lee BC, Kim MK, Jang G, Oh HJ, Yuda F, Kim HJ, et al. Dogs cloned from adult somatic cells. *Nature*. 4 de agosto de 2005;436(7051):641.
24. Shin T, Kraemer D, Pryor J, Liu L, Rugila J, Howe L, et al. A cat cloned by nuclear transplantation. *Nature*. 21 de febrero de 2002;415(6874):859.
25. Fernández-Tresguerres, Jesús A. Fisiología humana 4a. ed., 4 Ej | Fisiología, Libro de biología y Ciencias de la salud [Internet]. Pinterest. [citado 23 de noviembre de 2019]. Disponible en: <https://www.pinterest.com/pin/342766221631149316/>
26. Harman D. The free radical theory of aging. *Antioxid Redox Signal*. octubre de 2003;5(5):557-61.

27. Röhme D. Evidence for a relationship between longevity of mammalian species and life spans of normal fibroblasts in vitro and erythrocytes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* agosto de 1981;78(8):5009-13.
28. Ames BN. Mutagenesis and carcinogenesis: Endogenous and exogenous factors. *Environ Mol Mutagen.* 1989;14(S16):66-77.
29. Buffenstein R, Edrey YH, Yang T, Mele J. The oxidative stress theory of aging: embattled or invincible? Insights from non-traditional model organisms. *Age Dordr Neth.* septiembre de 2008;30(2-3):99-109.
30. 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.* 17 de 2018;9(1):349.
31. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013;14(10):R115.
32. Rando TA, Chang HY. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. *Cell.* 20 de enero de 2012;148(1-2):46-57.
33. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol.* 2013;14(10):R115.
34. Niehrs C, Calkhoven CF. Emerging Role of C/EBP β and Epigenetic DNA Methylation in Ageing. *Trends Genet TIG.* febrero de 2020;36(2):71-80.
35. Raj K. Chapter 4 - The Epigenetic Clock and Aging. En: Moskalev A, Vaiserman AM, editores. *Epigenetics of Aging and Longevity* [Internet]. Boston: Academic Press; 2018 [citado 28 de enero de 2020]. p. 95-118. (Translational Epigenetics; vol. 4). Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128110607000048>
36. Horvath S, Pirazzini C, Bacalini MG, Gentilini D, Di Blasio AM, Delledonne M, et al. Decreased epigenetic age of PBMCs from Italian semi-supercentenarians and their offspring. *Aging.* diciembre de 2015;7(12):1159-70.
37. Horvath S, Ritz BR. Increased epigenetic age and granulocyte counts in the blood of Parkinson's disease patients. *Aging.* diciembre de 2015;7(12):1130-42.
38. Horvath S, Langfelder P, Kwak S, Aaronson J, Rosinski J, Vogt TF, et al. Huntington's disease accelerates epigenetic aging of human brain and disrupts DNA methylation levels. *Aging.* 2016;8(7):1485-512.

39. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, et al. Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Mol Cell*. 24 de enero de 2013;49(2):359-67.
40. Sivanand S, Viney I, Wellen KE. Spatiotemporal control of acetyl-CoA metabolism in chromatin regulation. *Trends Biochem Sci*. enero de 2018;43(1):61-74.
41. Petkovich DA, Podolskiy DI, Lobanov AV, Lee S-G, Miller RA, Gladyshev VN. Using DNA Methylation Profiling to Evaluate Biological Age and Longevity Interventions. *Cell Metab*. 4 de abril de 2017;25(4):954-960.e6.
42. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. *Cell*. 6 de junio de 2013;153(6):1194-217.
43. Sager R. Senescence as a mode of tumor suppression. *Environ Health Perspect*. junio de 1991;93:59-62.
44. Chambers SM, Shaw CA, Gatz C, Fisk CJ, Donehower LA, Goodell MA. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol*. agosto de 2007;5(8):e201.
45. Armstrong L, Al-Aama J, Stojkovic M, Lako M. Concise review: the epigenetic contribution to stem cell ageing: can we rejuvenate our older cells? *Stem Cells Dayt Ohio*. septiembre de 2014;32(9):2291-8.
46. Li Y, Wu Q, Wang Y, Li L, Bu H, Bao J. Senescence of mesenchymal stem cells (Review). *Int J Mol Med*. 1 de abril de 2017;39(4):775-82.
47. Chen J-H, Yip CYY, Sone ED, Simmons CA. Identification and characterization of aortic valve mesenchymal progenitor cells with robust osteogenic calcification potential. *Am J Pathol*. marzo de 2009;174(3):1109-19.
48. Miller JD, Ganat YM, Kishinevsky S, Bowman RL, Liu B, Tu EY, et al. Human iPSC-based modeling of late-onset disease via progerin-induced aging. *Cell Stem Cell*. 5 de diciembre de 2013;13(6):691-705.
49. Alves H, Munoz-Najar U, De Wit J, Renard AJS, Hoeijmakers JHJ, Sedivy JM, et al. A link between the accumulation of DNA damage and loss of multipotency of human mesenchymal stromal cells. *J Cell Mol Med*. diciembre de 2010;14(12):2729-38.
50. Altanerova V, Horvathova E, Matuskova M, Kucerova L, Altaner C. Genotoxic damage of human adipose-tissue derived mesenchymal stem cells triggers their terminal differentiation. *Neoplasma*. 2009;56(6):542-7.
51. Galderisi U, Helmbold H, Squillaro T, Alessio N, Komm N, Khadang B, et al. In vitro senescence of rat mesenchymal stem cells is accompanied by

- downregulation of stemness-related and DNA damage repair genes. *Stem Cells Dev.* septiembre de 2009;18(7):1033-42.
52. Zammit PS, Partridge TA, Yablonka-Reuveni Z. The skeletal muscle satellite cell: the stem cell that came in from the cold. *J Histochem Cytochem Off J Histochem Soc.* noviembre de 2006;54(11):1177-91.
 53. Conboy IM, Rando TA. Aging, stem cells and tissue regeneration: lessons from muscle. *Cell Cycle Georget Tex.* marzo de 2005;4(3):407-10.
 54. Brack AS, Conboy MJ, Roy S, Lee M, Kuo CJ, Keller C, et al. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science.* 10 de agosto de 2007;317(5839):807-10.
 55. Baker DJ, Wijshake T, Tchkonia T, LeBrasseur NK, Childs BG, van de Sluis B, et al. Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. *Nature.* 2 de noviembre de 2011;479(7372):232-6.
 56. Shin MG, Kajigaya S, McCoy JP, Levin BC, Young NS. Marked mitochondrial DNA sequence heterogeneity in single CD34+ cell clones from normal adult bone marrow. *Blood.* 15 de enero de 2004;103(2):553-61.
 57. Yao Y-G, Kajigaya S, Feng X, Samsel L, McCoy JP, Torelli G, et al. Accumulation of mtDNA variations in human single CD34+ cells from maternally related individuals: effects of aging and family genetic background. *Stem Cell Res.* mayo de 2013;10(3):361-70.
 58. Xing Z, Ryan MA, Daria D, Nattamai KJ, Van Zant G, Wang L, et al. Increased hematopoietic stem cell mobilization in aged mice. *Blood.* 1 de octubre de 2006;108(7):2190-7.
 59. Wang L, Yang L, Debidda M, Witte D, Zheng Y. Cdc42 GTPase-activating protein deficiency promotes genomic instability and premature aging-like phenotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23 de enero de 2007;104(4):1248-53.
 60. Cieślak-Pobuda A, Knoflach V, Ringh MV, Stark J, Likus W, Siemianowicz K, et al. Transdifferentiation and reprogramming: Overview of the processes, their similarities and differences. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* julio de 2017;1864(7):1359-69.
 61. Essentials of Stem Cell Biology | ScienceDirect [Internet]. [citado 15 de mayo de 2021]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/book/9780124095038/essentials-of-stem-cell-biology>
 62. Eguizabal C, Montserrat N, Veiga A, Belmonte JCI. Dedifferentiation, Transdifferentiation, and Reprogramming: Future Directions in Regenerative Medicine. *Semin Reprod Med.* enero de 2013;31(1):82-94.

63. Pelayo R, S-OJ, Velasco I. *Celulas troncales y medicina regenerativa*. 1.^a ed. Vol. 1. CDMX: UNAM; 2013. 357 p.
64. Niemann H, Lucas-Hahn A. Somatic cell nuclear transfer cloning: practical applications and current legislation. *Reprod Domest Anim Zuchthyg*. agosto de 2012;47 Suppl 5:2-10.
65. Jaenisch R, Young R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*. 22 de febrero de 2008;132(4):567-82.
66. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 27 de febrero de 1997;385(6619):810-3.
67. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 30 de noviembre de 2007;131(5):861-72.
68. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell*. 2 de julio de 2015;17(1):11-22.
69. Vallier L, Mancip J, Markossian S, Lukaszewicz A, Dehay C, Metzger D, et al. An efficient system for conditional gene expression in embryonic stem cells and in their in vitro and in vivo differentiated derivatives. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 27 de febrero de 2001;98(5):2467-72.
70. Beyret E, Martinez Redondo P, Platero Luengo A, Izpisua Belmonte JC. Elixir of Life: Thwarting Aging With Regenerative Reprogramming. *Circ Res*. 05 de 2018;122(1):128-41.
71. Gladyshev VN. Aging: progressive decline in fitness due to the rising deleteriome adjusted by genetic, environmental, and stochastic processes. *Aging Cell*. 2016;15(4):594-602.
72. Galkin F, Zhang B, Dmitriev SE, Gladyshev VN. Reversibility of irreversible aging. *Ageing Res Rev*. 2019;49:104-14.
73. Vermeulen A. [Juvenile hormones, reality or myth?]. *Verh - K Acad Voor Geneeskde Van Belg*. 1997;59(1):19-33.
74. Kucharski R, Maleszka J, Foret S, Maleszka R. Nutritional Control of Reproductive Status in Honeybees via DNA Methylation. *Science*. 28 de marzo de 2008;319(5871):1827-30.
75. O'Sullivan RJ, Kubicek S, Schreiber SL, Karlseder J. Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres. *Nat Struct Mol Biol*. octubre de 2010;17(10):1218-25.

76. Ren R, Deng L, Xue Y, Suzuki K, Zhang W, Yu Y, et al. Visualization of aging-associated chromatin alterations with an engineered TALE system. *Cell Res.* abril de 2017;27(4):483-504.
77. Taguchi J, Yamada Y. In vivo reprogramming for tissue regeneration and organismal rejuvenation. *Curr Opin Genet Dev.* octubre de 2017;46:132-40.
78. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature.* 17 de febrero de 2005;433(7027):760-4.
79. Till JE, McCULLOCH EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* febrero de 1961;14:213-22.
80. Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol.* agosto de 2006;169(2):338-46.
81. Cieślak-Pobuda A, Knoflach V, Ringh MV, Stark J, Likus W, Siemianowicz K, et al. Transdifferentiation and reprogramming: Overview of the processes, their similarities and differences. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1 de julio de 2017;1864(7):1359-69.
82. Trounson A, DeWitt ND. Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nat Rev Mol Cell Biol.* marzo de 2016;17(3):194-200.
83. Sancho-Martinez I, Baek SH, Izpisua Belmonte JC. Lineage conversion methodologies meet the reprogramming toolbox. *Nat Cell Biol.* septiembre de 2012;14(9):892-9.
84. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell.* 24 de diciembre de 1987;51(6):987-1000.
85. Graf T, Enver T. Forcing cells to change lineages. *Nature.* 3 de diciembre de 2009;462(7273):587-94.
86. Sekiya S, Suzuki A. Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature.* julio de 2011;475(7356):390-3.
87. Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, Kokubu Y, Südhof TC, Wernig M. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. *Nature.* 25 de febrero de 2010;463(7284):1035-41.
88. Antoni van Blitterswijk C, Moroni L, Jeroen Rouwkema, Siddappa R, Jérôme Sohier. Chapter 1: Stem Cells. En: *Tissue engineering. First.* Amsterdam Academic; 2008. p. 1-26.

89. Qian L, Huang Y, Spencer CI, Foley A, Vedantham V, Liu L, et al. In vivo reprogramming of murine cardiac fibroblasts into induced cardiomyocytes. *Nature*. 31 de mayo de 2012;485(7400):593-8.
90. Su Z, Niu W, Liu M-L, Zou Y, Zhang C-L. In vivo conversion of astrocytes to neurons in the injured adult spinal cord. *Nat Commun*. 25 de febrero de 2014;5:3338.
91. Ocampo A, Reddy P, Belmonte JCI. Anti-Aging Strategies Based on Cellular Reprogramming. *Trends Mol Med*. 1 de agosto de 2016;22(8):725-38.
92. Godic A. The role of stem cells in anti-aging medicine. *Clin Dermatol*. 1 de julio de 2019;37(4):320-5.
93. Sogabe Y, Seno H, Yamamoto T, Yamada Y. Unveiling epigenetic regulation in cancer, aging, and rejuvenation with in vivo reprogramming technology. *Cancer Sci*. septiembre de 2018;109(9):2641-50.
94. Ohnishi K, Semi K, Yamamoto T, Shimizu M, Tanaka A, Mitsunaga K, et al. Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell*. 13 de febrero de 2014;156(4):663-77.
95. Abad M, Mosteiro L, Pantoja C, Cañamero M, Rayon T, Ors I, et al. Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature*. 17 de octubre de 2013;502(7471):340-5.
96. Urfer SR, Wang M, Yang M, Lund EM, Lefebvre SL. Risk Factors Associated with Lifespan in Pet Dogs Evaluated in Primary Care Veterinary Hospitals. *J Am Anim Hosp Assoc*. 14 de marzo de 2019;55(3):130-7.
97. Bonnett BN, Egenvall A, Hedhammar A, Olson P. Mortality in over 350,000 insured Swedish dogs from 1995-2000: I. Breed-, gender-, age- and cause-specific rates. *Acta Vet Scand*. 2005;46(3):105-20.
98. Fleming JM, Creevy KE, Promislow DEL. Mortality in north american dogs from 1984 to 2004: an investigation into age-, size-, and breed-related causes of death. *J Vet Intern Med*. abril de 2011;25(2):187-98.
99. Urfer SR, Greer K, Wolf NS. Age-related cataract in dogs: a biomarker for life span and its relation to body size. *Age Dordr Neth*. septiembre de 2011;33(3):451-60.
100. German AJ. The Growing Problem of Obesity in Dogs and Cats. *J Nutr*. 1 de julio de 2006;136(7):1940S-1946S.

101. Kealy RD, Olsson SE, Monti KL, Lawler DF, Biery DN, Helms RW, et al. Effects of limited food consumption on the incidence of hip dysplasia in growing dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 15 de septiembre de 1992;201(6):857-63.
102. Kealy RD, Lawler DF, Ballam JM, Mantz SL, Biery DN, Greeley EH, et al. Effects of diet restriction on life span and age-related changes in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1 de mayo de 2002;220(9):1315-20.
103. Kealy RD, Lawler DF, Ballam JM, Lust G, Smith GK, Biery DN, et al. Five-year longitudinal study on limited food consumption and development of osteoarthritis in coxofemoral joints of dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 15 de enero de 1997;210(2):222-5.
104. Kealy RD, Lawler DF, Ballam JM, Lust G, Biery DN, Smith GK, et al. Evaluation of the effect of limited food consumption on radiographic evidence of osteoarthritis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 1 de diciembre de 2000;217(11):1678-80.
105. Larson BT, Lawler DF, Spitznagel EL, Kealy RD. Improved glucose tolerance with lifetime diet restriction favorably affects disease and survival in dogs. *J Nutr.* septiembre de 2003;133(9):2887-92.
106. Pittari J, Rodan I, Beekman G, Gunn-Moore D, Polzin D, Taboada J, et al. American Association of Feline Practitioners: Senior Care Guidelines. *J Feline Med Surg.* 1 de septiembre de 2009;11(9):763-78.
107. Gates MC, Hinds HJ, Dale A. Preliminary description of aging cats and dogs presented to a New Zealand first-opinion veterinary clinic at end-of-life. *N Z Vet J.* noviembre de 2017;65(6):313-7.
108. Creevy KE, Austad SN, Hoffman JM, O'Neill DG, Promislow DEL. The Companion Dog as a Model for the Longevity Dividend. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 4 de enero de 2016;6(1):a026633.
109. Ocampo A, Reddy P, Martinez-Redondo P, Platero-Luengo A, Hatanaka F, Hishida T, et al. In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell.* 15 de diciembre de 2016;167(7):1719-1733.e12.
110. Concurrent Disorders in Dogs With Diabetes Mellitus: 221 Cases (1993-1998) - PubMed [Internet]. [citado 8 de abril de 2020]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11043687/?dopt=Abstract>
111. Hess RS, Saunders HM, Van Winkle TJ, Ward CR. Concurrent disorders in dogs with diabetes mellitus: 221 cases (1993-1998). *J Am Vet Med Assoc.* 15 de octubre de 2000;217(8):1166-73.
112. Garbern JC, Lee RT. Cardiac Stem Cell Therapy and the Promise of Heart Regeneration. *Cell Stem Cell.* 6 de junio de 2013;12(6):689-98.

113. Bond BR. Problems in veterinary ultrasonographic analysis of acquired heart disease. *Probl Vet Med*. diciembre de 1991;3(4):520-54.
114. Ieda M, Fu J-D, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell*. 6 de agosto de 2010;142(3):375-86.
115. Song K, Nam Y-J, Luo X, Qi X, Tan W, Huang GN, et al. Heart repair by reprogramming non-myocytes with cardiac transcription factors. *Nature*. 13 de mayo de 2012;485(7400):599-604.
116. Jayawardena TM, Egemnazarov B, Finch EA, Zhang L, Payne JA, Pandya K, et al. MicroRNA-mediated in vitro and in vivo direct reprogramming of cardiac fibroblasts to cardiomyocytes. *Circ Res*. 25 de mayo de 2012;110(11):1465-73.
117. Chapter-7-Stem-Cell-Niches_2009_Essentials-of-Stem-Cell-Biology-Second-Edition-.pdf.
118. Kriegstein A, Alvarez-Buylla A. The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu Rev Neurosci*. 2009;32:149-84.
119. Srivastava D, DeWitt N. In Vivo Cellular Reprogramming: The Next Generation. *Cell*. 8 de septiembre de 2016;166(6):1386-96.
120. Mosteiro L, Pantoja C, Alcazar N, Marión RM, Chondronasiou D, Rovira M, et al. Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science*. 25 de 2016;354(6315).
121. Karow M, Sánchez R, Schichor C, Masserdotti G, Ortega F, Heinrich C, et al. Reprogramming of Pericyte-Derived Cells of the Adult Human Brain into Induced Neuronal Cells. *Cell Stem Cell*. 5 de octubre de 2012;11(4):471-6.
122. Guo Z, Zhang L, Wu Z, Chen Y, Wang F, Chen G. In Vivo Direct Reprogramming of Reactive Glial Cells into Functional Neurons after Brain Injury and in an Alzheimer's Disease Model. *Cell Stem Cell*. 6 de febrero de 2014;14(2):188-202.
123. Rivetti di Val Cervo P, Romanov RA, Spigolon G, Masini D, Martín-Montañez E, Toledo EM, et al. Induction of functional dopamine neurons from human astrocytes in vitro and mouse astrocytes in a Parkinson's disease model. *Nat Biotechnol*. 2017;35(5):444-52.
124. Moshref M, Tangey B, Gilor C, Papas KK, Williamson P, Loomba-Albrecht L, et al. Concise Review: Canine Diabetes Mellitus as a Translational Model for Innovative Regenerative Medicine Approaches. *Stem Cells Transl Med*. mayo de 2019;8(5):450-5.

125. Niessen SJM, Hazuchova K, Powney SL, Guitian J, Niessen APM, Pion PD, et al. The Big Pet Diabetes Survey: Perceived Frequency and Triggers for Euthanasia. *Vet Sci*. 14 de mayo de 2017;4(2).
126. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature*. 2 de octubre de 2008;455(7213):627-32.
127. Gruessner AC, Gruessner RWG. Pancreas Transplantation for Patients with Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus in the United States: A Registry Report. *Gastroenterol Clin North Am*. junio de 2018;47(2):417-41.
128. Ahearn AJ, Parekh JR, Posselt AM. Islet transplantation for Type 1 diabetes: where are we now? *Expert Rev Clin Immunol*. 2 de enero de 2015;11(1):59-68.
129. Yang HK, Ham D-S, Park H-S, Rhee M, You YH, Kim MJ, et al. Long-term Efficacy and Biocompatibility of Encapsulated Islet Transplantation With Chitosan-Coated Alginate Capsules in Mice and Canine Models of Diabetes. *Transplantation*. febrero de 2016;100(2):334-43.
130. Al-Hasani K, Pfeifer A, Courtney M, Ben-Othman N, Gjernes E, Vieira A, et al. Adult duct-lining cells can reprogram into β -like cells able to counter repeated cycles of toxin-induced diabetes. *Dev Cell*. 15 de julio de 2013;26(1):86-100.
131. Courtney M, Gjernes E, Druelle N, Ravaud C, Vieira A, Ben-Othman N, et al. The inactivation of Arx in pancreatic α -cells triggers their neogenesis and conversion into functional β -like cells. *PLoS Genet*. octubre de 2013;9(10):e1003934.
132. Sancho R, Gruber R, Gu G, Behrens A. Loss of Fbw7 reprograms adult pancreatic ductal cells into α , δ , and β cells. *Cell Stem Cell*. 7 de agosto de 2014;15(2):139-53.
133. Baeyens L, Lemper M, Leuckx G, De Groef S, Bonfanti P, Stangé G, et al. Retraction Note: Transient cytokine treatment induces acinar cell reprogramming and regenerates functional beta cell mass in diabetic mice. *Nat Biotechnol*. marzo de 2020;38(3):374.
134. Schonhoff SE, Giel-Moloney M, Leiter AB. Neurogenin 3-expressing progenitor cells in the gastrointestinal tract differentiate into both endocrine and non-endocrine cell types. *Dev Biol*. 15 de junio de 2004;270(2):443-54.
135. Talchai C, Xuan S, Kitamura T, DePinho RA, Accili D. Generation of functional insulin-producing cells in the gut by Foxo1 ablation. *Nat Genet*. 11 de marzo de 2012;44(4):406-12, S1.

136. Chen Y-J, Finkbeiner SR, Weinblatt D, Emmett MJ, Tameire F, Yousefi M, et al. De novo formation of insulin-producing «neo- β cell islets» from intestinal crypts. *Cell Rep.* 27 de marzo de 2014;6(6):1046-58.
137. Morris SA, Cahan P, Li H, Zhao AM, San Roman AK, Shivdasani RA, et al. Dissecting Engineered Cell Types and Enhancing Cell Fate Conversion via CellNet. *Cell.* 14 de agosto de 2014;158(4):889-902.
138. Suzuki T, Mandai M, Akimoto M, Yoshimura N, Takahashi M. The Simultaneous Treatment of MMP-2 Stimulants in Retinal Transplantation Enhances Grafted Cell Migration into the Host Retina. *STEM CELLS.* 2006;24(11):2406-11.
139. West EL, Pearson RA, Tschernutter M, Sowden JC, MacLaren RE, Ali RR. Pharmacological disruption of the outer limiting membrane leads to increased retinal integration of transplanted photoreceptor precursors. *Exp Eye Res.* 1 de abril de 2008;86(4):601-11.
140. Suzuki T, Akimoto M, Imai H, Ueda Y, Mandai M, Yoshimura N, et al. Chondroitinase ABC treatment enhances synaptogenesis between transplant and host neurons in model of retinal degeneration. *Cell Transplant.* 2007;16(5):493-503.
141. D'Amore A, Yoshizumi T, Luketich SK, Wolf MT, Gu X, Cammarata M, et al. Bi-layered polyurethane – Extracellular matrix cardiac patch improves ischemic ventricular wall remodeling in a rat model. *Biomaterials.* 1 de noviembre de 2016;107:1-14.
142. Vivien C, Scerbo P, Girardot F, Blay KL, Demeneix BA, Coen L. Non-viral Expression of Mouse Oct4, Sox2, and Klf4 Transcription Factors Efficiently Reprograms Tadpole Muscle Fibers in Vivo. *J Biol Chem.* 3 de febrero de 2012;287(10):7427-35.
143. Rosselló RA, Chen C-C, Dai R, Howard JT, Hochgeschwender U, Jarvis ED. Mammalian genes induce partially reprogrammed pluripotent stem cells in non-mammalian vertebrate and invertebrate species. *eLife.* 3 de septiembre de 2013;2:e00036.
144. Lu Y, West FD, Jordan BJ, Mumaw JL, Jordan ET, Gallegos-Cardenas A, et al. Avian-Induced Pluripotent Stem Cells Derived Using Human Reprogramming Factors. *Stem Cells Dev.* 4 de octubre de 2011;21(3):394-403.
145. Ogorevc J, Orehek S, Dovč P. Cellular reprogramming in farm animals: an overview of iPSC generation in the mammalian farm animal species. *J Anim Sci Biotechnol.* 2016;7:10.
146. Ramamoorth M, Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy- an overview. *J Clin Diagn Res JCDR.* enero de 2015;9(1):GE01-06.

147. Jooss K, Chirmule N. Immunity to adenovirus and adeno-associated viral vectors: implications for gene therapy. *Gene Ther.* junio de 2003;10(11):955-63.
148. Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol.* julio de 2008;26(7):795-7.
149. Beyret E, Izpisua Belmonte JC. The XEN of reprogramming. *Cell Res.* febrero de 2016;26(2):147-8.
150. Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science.* 9 de agosto de 2013;341(6146):651-4.
151. Freeman LM. Cachexia and Sarcopenia: Emerging Syndromes of Importance in Dogs and Cats. *J Vet Intern Med.* 2012;26(1):3-17.
152. Vite CH, Head E. Aging in the Canine and Feline Brain. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1 de noviembre de 2014;44(6):1113-29.
153. Wiggs RB, Lobprise H, Mitchell PQ. Oral and periodontal tissue. Maintenance, augmentation, rejuvenation, and regeneration. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* septiembre de 1998;28(5):1165-88, vii.
154. Savage N. New tricks from old dogs join the fight against ageing. *Nature.* 13 de diciembre de 2017;552(7684):S57-9.