



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

UNA COMPILACIÓN ACTUAL SOBRE
LAS CÉLULAS TRONCALES: CONCEPTOS
BÁSICOS, USOS, TERAPIAS Y PERSPECTIVAS
EN LA MEDICINA VETERINARIA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

P R E S E N T A :

NORMA THELMA YBARRA NAVARRO

ASESOR: M. en C. MIGUEL ANGEL CORNEJO CORTÉS.
COASESORA: M. en C. CAROLINA PIÑA VÁZQUEZ.

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO. 2004.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Una compilación actual sobre las células troncales: Conceptos básicos, usos, terapias y perspectivas en la Medicina Veterinaria.

que presenta La pasante: Norma Thelma Ybarra Navarro
con número de cuenta: 9855706-8 para obtener el título de :
Médica Veterinaria Zootecnista

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Noviembre de 2003

PRESIDENTE M.C. Carlos Ignacio Soto Zárate

VOCAL M.C. Miguel Angel Cornejo Cortés

SECRETARIO MVZ. Javier Froylán Lazcano Reyes

PRIMER SUPLENTE M.C. Cynthia González Ruiz

SEGUNDO SUPLENTE MVZ. Hugo Ramírez Alvarez

DEDICATORIA:

A mi Mamá:

Gracias Mama por todo lo que has hecho por mi y por mis hermanos, por tu amor, esfuerzo y dedicación, ya que sin ti no hubiera podido lograr todo lo que he logrado, eres mi ejemplo y estoy muy orgullosa de tí.

A mi Heisel:

Porque aunque ya no estás conmigo físicamente, siempre estarás en mi pensamiento y en mi corazón, gracias por tu amor incondicional.

AGRADECIMIENTOS:

Gracias al Dr. Miguel Angel Cornejo Cortés, por sus consejos, apoyo y orientación en la realización de este trabajo.

Gracias a la M. en C. Carolina Piña por su orientación y ayuda en la realización de este trabajo.

Gracias al M.V.Z. Germán Isauro Garrido Fariña del laboratorio de Apoyo a Histología, por sus asesoría y comentarios en la redacción del trabajo.

Gracias al Biólogo Héctor Mauricio Suárez Gómez, del Departamento de Biomedicina Molecular del CINVESTAV, por su asesoría en la realización del presente trabajo y por su apoyo en la obtención de bibliográfica.

Gracias a todos los académicos que aportaron sus conocimientos y experiencia para mi formación como profesionista.

Especialmente quisiera agradecer a Dr. Miguel Angel Cornejo Cortés, Dr. Alfredo Cuellar Ordaz, Dr. Juan Carlos del Rio García, Dr. Enrique Esperón, Dr. Pablo Martinez Labat, Dra. Margarita Pinto Sagahón, Dr. Jorge Tórtora, Dr. Guillermo Valdivia, porque realmente aprendí mucho de ustedes, muchas gracias por su ayuda y paciencia durante toda la carrera, también quiero decirles que los admiro mucho desde el punto de vista profesional y personal.

Gracias a mis hermanos Toño y Mundo y a mi tío Miguel, por su cariño y apoyo.

A mis padrinos la Sra. Esperanza Barrios vda. de Zenteno y el Dr. Raúl Zenteno Barrios por su cariño.

A mis amigas Karla, Lucia, Sofia, Haydée por escucharme cuando lo he necesitado y por todos los ratos de alegría y a veces tristeza que compartieron conmigo.

ÍNDICE

1. Índice	
2. Resumen	
3. Objetivos	
4. Procedimiento	
5. Introducción	1
5.1. Definición	1
5.2. Historia	2
6. Conceptos básicos	8
6.1. Particularidades	8
6.2. Clasificación	10
6.3. Características generales <i>in vitro</i>	14
6.4. Características generales <i>in vivo</i>	19
6.5. Estrategias para la obtención	22
7. Biología de las células troncales	31
7.1. Biología	34
7.2. Papel en la renovación celular	41
7.3. Plasticidad	45
8. Usos actuales y potenciales de las células troncales	54
8.1. Terapias celulares y Transplantes	54
8.2. Terapias experimentales con células troncales	69
8.2.1. Sistema Nervioso Central	69
8.2.2. Diabetes	74

8.2.3. Infarto al miocardio	76
9. Reprogramación directa de células somáticas	79
10. Reconstrucción de tejidos y órganos con células troncales	83
10.1. Reconstrucción de Piel	84
10.2. Reconstrucción de tejidos a partir de células troncales mesenquimales.	86
11. Células troncales y su relación con cáncer	91
11.1. Células troncales del Cáncer y organogénesis aberrante	94
12. Usos de las células troncales en la Medicina Veterinaria	96
12.1. Animales transgénicos	96
12.2. Animales knock out	102
12.3. Animales knock in	105
12.4. Aplicaciones de los Animales Transgénicos dentro de la Biomedicina y la Industria Agropecuaria.	106
12.4.1. Expresión de proteínas.	106
12.4.2. Modelos Animales	110
12.4.3. Xenotransplantes	112
12.4.4. Mejoramiento genético	114
13. Conclusiones	116
14. Glosario	119
15. Abreviaturas	124
16. Bibliografía	126

Índice de Figuras y Cuadros

Figura 1.	Fase de división celular de Cigoto a Blastocisto.	11
Figura 2.	Reintegración de células ES a embriones en estado de mórula y blastocisto.	20
Figura 3.	Método de obtención y cultivo de células ES a partir del macizo celular interno de blastocistos.	25
Figura 4.	Diferenciación de las células troncales de la médula ósea	43
Figura 5.	Plasticidad de las células troncales de adulto	53
Figura 6.	Integración al azar de ADN exógeno	98
Tabla 1.	Marcadores de superficie	15

2. RESUMEN

Las células troncales son células no diferenciadas capaces de autorrenovarse, es decir, tienen la capacidad de proliferar y producir células idénticas; según su origen (embriones, fetos ó adultos) y localización. Cuentan con diversos potenciales de diferenciación dando origen a células hijas comprometidas en determinadas rutas de desarrollo, las cuales se convertirán en tipos celulares especializados. También tienen la propiedad de reintegrarse a la embriogénesis, dando como resultado a los llamados animales quiméricos, los cuales a su vez pueden dar origen a un animal transgénico. Actualmente se está comenzando a descifrar la compleja biología de las células troncales, con el fin de explicar y después manipular, procesos tan complejos como; la diferenciación, la plasticidad (células troncales) y en el caso de las células somáticas la reprogramación, estos fenómenos han despertado gran interés debido a que es posible aplicarlos dentro en áreas como: terapia alternativa para diversos desórdenes y enfermedades, reconstrucción de órganos y tejidos, estudio de la oncogénesis, y por supuesto, el desarrollo de animales transgénicos a través de la modificación genética por transferencia ó adición de ADN exógeno en el genoma de las células troncales. Una de las aplicaciones donde el M.V.Z. está más involucrado es la generación y utilización de animales transgénicos, por ejemplo para la producción de ciertas proteínas, de importancia biológica. Sin embargo, la barrera más grande que se debe superar es el hecho de que la utilización de transgénicos para consumo humano, aún no es ampliamente aceptada por la comunidad en general. Considerando los usos

y aplicaciones actuales y futuros de estas células, se puede concluir que este tema es de gran importancia no sólo dentro del área médica, sino también en el área médica veterinaria.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Realizar una investigación bibliográfica actualizada en relación al conocimiento de las células troncales, basada en artículos publicados en revistas científicas.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Compilar la información obtenida haciendo énfasis en su historia, conceptos básicos, usos actuales y perspectivas dentro de la medicina veterinaria.
- Elaborar un resumen mediante un lenguaje accesible, que sirva de consulta para alumnos y docentes relacionados con las materias de Citología, Embriología e Histología, Fisiología, Genética, Reproducción y Patología.
- Incrementar el material de consulta para los estudiantes y académicos de la Sección de Ciencias Biológicas y Pecuarias.

4. PROCEDIMIENTO

1. Se realizó una recopilación de información a través de artículos publicados por revistas científicas, las cuales fueron consultadas en las bibliotecas de la F.E.S.–Cuautitlán, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M. y del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N.
2. Se consultó en Internet, aquellas páginas Web relacionadas con células troncales.
3. La información obtenida se organizó y se seleccionó basándose en los siguientes temas: conceptos básicos, biología, terapia, reconstrucción de órganos, relación con cáncer y principales usos en la medicina veterinaria.
4. El material seleccionado fue traducido y se realizó la lectura y estructuración de los conocimientos en los diferentes temas, realizando así una investigación bibliográfica actualizada y lo más completa posible.

5. INTRODUCCIÓN

5.1. DEFINICIÓN

Las células troncales también se conocen como: células madre, células progenitoras, células "stem" (del inglés stem cells, stem = tronco). Son células no diferenciadas capaces de autorrenovarse, es decir tienen la capacidad de proliferar y producir células idénticas, también son pluripotenciales, lo que quiere decir que en condiciones específicas pueden diferenciarse para dar origen a células hijas comprometidas en rutas determinadas de desarrollo, por lo que se convertirán en tipos celulares especializados. También tienen la propiedad de reintegrarse a la "embriogénesis", esto ocurre cuando son inyectadas en embriones blastocistos o agregadas a embriones en estado de mórula, contribuyendo así en la formación de todos los tejidos, incluyendo los gametos, dando como resultado a los llamados animales quiméricos (que tienen células en sus tejidos provenientes de 2 fondos genéticos distintos).¹⁻³

5.2. HISTORIA

En 1960, Pierce GB y col., realizaron la conversión ascítica de un teratocarcinoma originado en testículo, descubriendo gran cantidad de pequeñas estructuras “quísticas” que flotaban en el líquido peritoneal del hospedero; la estructura microscópica observada en estos agregados celulares asemejaba los primeros estadios del desarrollo embrionario; ellos postularon que las estructuras eran derivados embrionarios del teratocarcinoma y los denominaron cuerpos embrioides.⁴

En 1964, Kleinsmith LJ y col., demostraron que las células carcinómicas embrionarias obtenidas a partir de cuerpos embrioides derivados de teratocarcinomas son células stem multipotenciales.⁵

En 1966, Cole R y col., encontraron que a partir de embriones de conejo en estado de mórula, crecieron esporádicamente líneas celulares en varios tipos de medio de cultivo, aún cuando se incluyeron células alimentadoras, por otra parte, observaron que cultivos de blastocistos de conejo intactos de 5.5 días de edad, en medios reforzados con inductores de mesodermo y ocasionalmente con células alimentadoras, provocaban el agrupamiento celular a manera de láminas o crecimientos celulares libres. Las células del macizo interno migraron sobre un pavimento formado por trofoectodermo para formar varias estructuras y células individuales *in vitro*. Los crecimientos contenían músculo, tejido conectivo, neuronas y macrófagos entre otros tejidos no diferenciados, revelando la amplitud de tejidos que se podían obtener del macizo celular interno.⁶

Posteriormente en otro experimento, disecaron macizos celulares internos de blastocistos de conejo de 6 días de edad y los colocaron en cubiertas revestidas de colágeno con pequeñas cantidades de medio, las superficies internas cercanas al colágeno se adhirieron después de 10–15 horas. Capas multicelulares de tejido formaron monocapas migratorias fibroblásticas y epitelioideas que crecieron sobre la capa de colágeno en un día o dos. Algunas colonias se adhirieron directamente al vidrio, facilitando el pasaje de líneas celulares por tripsinización para ser establecidas. Así derivaron 20 cultivos *in vitro*, como líneas celulares distintas que presentaban propiedades de sobrevivencia a largo plazo, es decir, lo que hoy se denomina inmortalidad.⁶

En 1967, Richard Gardner realizó la inserción de células troncales embrionarias provenientes de blastocistos preimplantados en la cavidad blastocélica de ratón, para determinar si éstas podían unirse al macizo celular interno para producir quimeras, lo cual funcionó, dando como resultado ratones con un patrón de color típico en su pelaje.⁷

En 1969, Edwards logró la fertilización y maduración *in vitro* de ovocitos humanos.⁸

En 1970, Steptoe, realizó la aspiración de ovocitos maduros provenientes de folículos humanos obtenidos después de una terapia con gonadotropinas,⁹ y en 1971 logró fertilizar y crecer embriones *in vitro* para desarrollar blastocistos humanos.¹⁰

En 1973, Artzt K y col., cultivaron células *in vitro* a partir de cuerpos embrioides disgregados; encontraron dos tipos de poblaciones celulares: células primitivas de teratocarcinoma (PTC) y células con tipo diferenciado

(DTC). A partir de antisueros singénicos, probaron que las células PTC presentan antígenos de superficie similares a las células embrionarias de ratón.¹¹

En 1974, Martin GR y col., mencionó que el crecimiento *in vitro* de las células PTC no es inhibido por una alta densidad celular, mientras que en las células DTC ocurre lo contrario.¹²

En 1975, Martin GR y col., reportaron la diferenciación de células pluripotenciales de carcinoma dando como resultado la formación *in vitro* de cuerpos embrioides.¹³

En 1975, Mintz B y col., obtuvieron células totipotenciales de teratocarcinoma (EC cells) a partir de cuerpos embrioides, las inyectan en blastocistos y obtienen ratones quiméricos.¹⁴

En 1981, dos grupos de investigadores el grupo de Evans MJ y col., y el grupo de Martin GR lograron la creación de las células stem embrionarias (ES), al establecer líneas de células totipotenciales desarrolladas a partir de blastocistos de ratón.^{15, 16}

En 1984, Bradley A y col., reportaron la creación de líneas germinales quiméricas funcionales derivadas de líneas celulares de teratocarcinoma.¹⁷

En 1986, Gossler A, y col., demostró que las células troncales (ES) de ratón pueden ser utilizadas como vehículo para realizar transgénesis.¹⁸

Para el año de 1987, Eistetter HR hizo una innovación interesante al obtener células ES a partir de mórulas de ratón disgregadas con EDTA (Etilen diamino tetracetato de sodio).¹⁹

En 1987, Thomas y Capecchi aplicaron la tecnología de flanqueo (targeting) de genes a células troncales embrionarias.²⁰

En 1987, Hollands P, inyectó células troncales hematopoyéticas (las cuales no pueden ser identificadas en células embrionarias de menos de 6 días de gestación) en ratones a los cuales se les irradió con dosis letales de rayos X, demostrando así, que éstas células primero colonizaban el hígado y después repoblaban los sistemas hematopoyéticos de los ratones irradiados. Descubrió también que las células embrionarias pueden ser transplantadas atravesando las barreras del complejo principal de histocompatibilidad al menos en la médula ósea adulta.²¹

En 1988 Hollands P, demostró que las células troncales hematopoyéticas también colonizaban el sistema hematopoyético de ratones normales, es decir, no irradiados.²²

En 1988, Williams RL, y col., demostraron que el factor inhibitorio de la leucemia (LIF) es la sustancia que permite mantener el fenotipo *in vitro* de la células troncales embrionarias de ratón.²³

En 1989, Gearing DP y col., realizaron la producción masiva del factor LIF murino y humano en *Escherichia coli*, como fuente, para su utilización en cultivos de células troncales embrionarias.²⁴

En 1990, Pease S y col., reportaron el aislamiento de células troncales embrionarias a partir de medios de cultivo suplementados con LIF y en ausencia de células alimentadoras o feeders.²⁵

En 1993, Kovacs MS y col., demostraron la utilización de ratonas superovuladas como donadoras de embriones para ser inyectados con células troncales embrionarias y producir así animales quiméricos; también mencionaron que no se afecta la viabilidad de los embriones al ser transferidos.²⁶

En 1993, Wood SA y col., realizaron la simple agregación de células troncales embrionarias en mórulas de ratón como un método alternativo a la inyección de blastocistos para producir animales quiméricos.²⁷

En 1994, Iannaccone PM y col., lograron producir animales quiméricos de especie diferente al ratón, inyectando células troncales embrionarias de rata en blastocistos de esta especie, desafortunadamente las características quiméricas no fueron heredables.²⁸

En 1996, Schoonjans L y col., produjeron conejos quiméricos inyectando células troncales embrionarias en blastocistos de la misma especie.²⁹

En 1998, Thomson JA, aisló células troncales pluripotenciales de macizos celulares internos provenientes de blastocistos humanos. El Dr. Thomson obtuvo los embriones de clínicas de fertilización *in vitro*. Describió que las células troncales pluripotenciales tenían cariotipos normales, que expresaban altos niveles de actividad de telomerasa y que después de proliferación indiferenciada *in vitro* por 4 o 5 meses, estas células aún mantenían el potencial de desarrollo para formar trofoblastos y derivados de las tres capas embrionarias.³⁰

Prácticamente al mismo tiempo, Shambloott, publicó un reporte acerca de las células germinales embrionarias de humano, las cuales obtuvo de las gónadas de fetos abortados.³¹

En 1999, Pittenger MF y col., señalaron que las células troncales mesenquimales humanas son multipotenciales, debido a que son capaces de dividirse permaneciendo como células indiferenciadas y que tienen el potencial de diferenciarse en líneas de tejidos mesenquimales como el hueso, cartílago, tejido adiposo, músculo y estroma de la médula ósea.³²

6. CONCEPTOS BÁSICOS

6.1. PARTICULARIDADES

Las células troncales son diferentes a los otros tipos de células que se encuentran en el cuerpo. Todas las células troncales sin importar la fuente de la que provengan, tienen tres características generales:³³

1. Son capaces de dividirse y renovarse a sí mismas por largos periodos. A diferencia de las células musculares, sanguíneas, nerviosas, entre otras; las cuales normalmente no se replican a sí mismas, las células troncales pueden autorreplicarse muchas veces. Cuando una población inicial de células troncales prolifera por varios meses en el laboratorio puede producir millones de células hijas; cuando las células resultantes continúan siendo no diferenciadas como las células de la población inicial, se dice que estas células son capaces de autorrenovarse a largo plazo. Los factores específicos y condiciones que permiten a las células troncales permanecer no especializadas o indiferenciadas son de gran interés actualmente, ya que ha tomado varios años aprender a cultivar en el laboratorio células troncales sin que se diferencien en otros tipos específicos de células.³³
2. Son células indiferenciadas (no especializadas). Una de las características fundamentales de las células troncales es que no poseen ninguna estructura específica de tejido que les permita realizar funciones especializadas. Una célula troncal no puede trabajar con células vecinas para bombear sangre al cuerpo tal como lo haría una célula muscular del

corazón, tampoco puede transportar moléculas de oxígeno a través de la sangre como un eritrocito.³³

3. Pueden dar origen a tipos celulares especializados. Cuando las células troncales indiferenciadas o no especializadas dan origen a células especializadas, el procedimiento se llama diferenciación. Actualmente se está empezando a descifrar y entender las señales internas y externas a la célula, que provocan la diferenciación de las células troncales. Las señales internas son controladas por genes, los cuales están entremezclados a través de largas cadenas de ADN, éstos llevan instrucciones codificadas para todas las estructuras y funciones de una célula. Las señales externas para la diferenciación celular incluyen: químicos secretados por otras células, como las citocinas, contacto físico con células vecinas, y ciertas moléculas en el microambiente.³³

6.2. CLASIFICACIÓN

Las células troncales pueden clasificarse en:

1. Células troncales totipotenciales
2. Células troncales pluripotenciales
3. Células troncales multipotenciales
4. Células troncales de órganos específicos

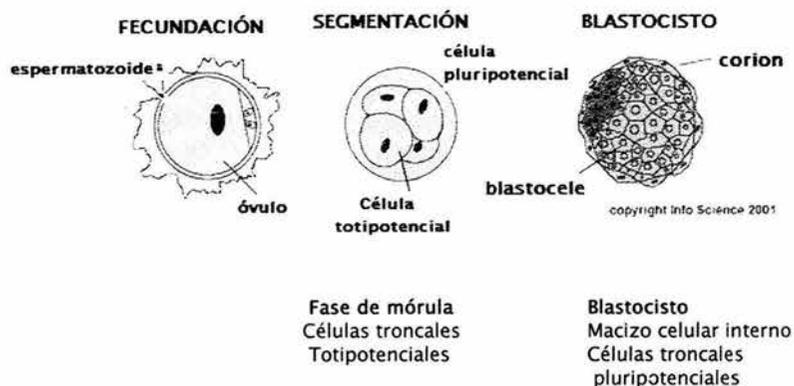
1. **Células troncales totipotenciales:** esto quiere decir que su potencial para originar otras células es total. Estas células tienen la capacidad de dar origen al embrión, hojas blastodérmicas del embrión, tejidos extraembrionarios y todos los tejidos y órganos postembrionarios. No se ha demostrado que las células troncales totipotenciales sean autorrenovables in vivo, por el contrario se cree que presentan autorrenovación limitada a lo largo de la vida.³⁴

Estas células tienen su origen cuando el espermatozoide fertiliza al ovocito formándose así una sola célula diploide llamada cigoto, la cuál se caracteriza por ser totipotencial, después de la etapa de cigoto, los embriones experimentan varias divisiones mitóticas (Figura 1). El cigoto es una célula bastante grande y tiene baja proporción núcleo/citoplasma. Para alcanzar una proporción similar a la de las células somáticas, experimenta divisiones celulares sin aumento de la masa celular. Este proceso se denomina escisión, para diferenciarlo de otras modalidades de división celular, en las cuales además, las células hijas se separan físicamente. Las células hijas que resultan de la escisión se denominan blastómeras, las cuales son células totipotenciales,

(idénticas), esto quiere decir que cualquiera de estas células puede dar origen a un individuo completo (Figura 1). Una vez que el embrión ha formado ocho a 16 blastómeras y en algunos casos más, se denomina mórula, las células totipotenciales que forman el estado de mórula comienzan a especializarse, dando origen a una esfera hueca de células, denominada blastocisto.³⁴

El blastocisto tiene una capa externa de células llamada en conjunto trofoblasto que formará la placenta y otros tejidos de sostén necesarios para el desarrollo del feto en el útero; dentro de la esfera se encuentra el macizo celular interno (masa de células internas), las cuales darán origen a todos los tejidos del embrión (Figura 1).³⁵

Figura 1. Fases de división celular de Cigoto a Blastocisto



Modificada de: <http://www.infoscience.fr/dossier/souches/souches1.html>

2. **Las células troncales pluripotenciales:** son las células que forman el macizo celular interno y pueden formar cualquier tipo de células que se encuentran en un individuo, aunque no son capaces de formar un individuo porque no pueden diferenciarse en células de la placenta (trofoblastos) y otros tejidos de sostén necesarios para el desarrollo del feto dentro del útero.³⁴

Las células troncales pluripotenciales no sólo dan origen a todos los tipos de células de un organismo, sino que también se diferencian *in vitro* en células del endodermo, ectodermo y mesodermo; cuando se encuentran en agregados tridimensionales se les llama cuerpos embrioides.³⁴

Durante el desarrollo embrionario, las células troncales pluripotenciales embrionarias sufren una restricción en la expresión del genoma, para dar origen a células que tienen una función particular, como por ejemplo, las células troncales multipotenciales sanguíneas, que dan origen a los eritrocitos, leucocitos y plaquetas, las cuales también se encuentran en adultos y niños.³⁴

3. **Las células troncales multipotenciales:** son células autorrenovables que se encuentran en la cima de la jerarquía celular y proliferan para producir células diferenciadas que formarán algún tejido *in vivo*. Es importante aclarar que estas células una vez desarrolladas se autorrenuevan durante toda la vida del organismo a diferencia de las células troncales totipotenciales y pluripotenciales las cuales sólo se encuentran durante la etapa embrionaria. En los organismos adultos, *in vivo*, las células troncales multipotenciales pueden dividirse repetidamente para repoblar un tejido o pueden presentar poca actividad como en el cerebro de los mamíferos.³⁶

Contrario a lo que se pensaba, las células troncales pueden encontrarse más tarde durante el desarrollo, actuando principalmente en la renovación de los tejidos, de esta manera se asegura la supervivencia a largo plazo de un organismo. Las células troncales multipotenciales pueden dividirse simétricamente durante el desarrollo para su proliferación, y asimétricamente para autorrenovarse, además de que pueden dar origen a una progenie de células más diferenciadas, las llamadas células troncales específicas de tejido.³⁶

4.Las células troncales específicas de tejido: éstas vuelven a sufrir una restricción en su genoma para producir tipos celulares característicos del tejido en el cual se observan *in vivo*.^{37,36}

Es más común nombrar a este tipo de células según el órgano o tejido al que dieron origen o en el que se encuentran *in vivo*, por ejemplo: células troncales hematopoyéticas, células troncales nerviosas, células troncales mesenquimales.³⁶

6.3. CARACTERÍSTICAS GENERALES *IN VITRO*

En diferentes puntos a lo largo del proceso de producción de líneas de células troncales embrionarias, se han hecho pruebas para conocer si éstas presentan características fundamentales que denoten que son células troncales embrionarias, a este proceso se le conoce como caracterización.³³

Hasta este momento los investigadores que trabajan con células troncales no se han puesto de acuerdo en una serie de pruebas estándares que midan las propiedades fundamentales de dichas células. Por lo tanto se sabe que muchas de las pruebas que se usan pueden no indicar varias de las propiedades y funciones biológicas más importantes de las células troncales embrionarias.³³

En los laboratorios donde se cultivan líneas de células troncales embrionarias se usan diferentes tipos de pruebas, éstas incluyen:

1. El crecimiento y subcultivo de las células troncales embrionarias por algunos meses. Esto asegura que las células tienen la habilidad de renovarse a sí mismas, dando origen al mismo tipo de células no especializadas por largos periodos (meses o años). Se observan los cultivos al microscopio para verificar que las células parezcan saludables y sigan indiferenciadas.³³
2. Cubriendo la superficie de todas las células de un organismo se encuentran proteínas especializadas, a las cuales se les conoce como receptores, éstos tienen la capacidad de unirse o adherirse a otras moléculas de señalización. Existe un sin número de diferentes tipos de receptores que difieren en su estructura y afinidad por las moléculas de señalización. Normalmente las

células utilizan estos receptores para unirse a moléculas como un medio de comunicación con otras células y así llevar a cabo las funciones apropiadas dentro del organismo. Estos mismos receptores de superficie sirven como marcadores para las células troncales, cada tipo celular diferenciado o no presenta cierta combinación de receptores en su superficie lo cual ayuda a distinguir una célula de otra.^{38,39}

También, existen factores de transcripción específicos para identificar células troncales, un ejemplo de éstos, es la proteína llamada Oct-4, la cual es producida generalmente por las células indiferenciadas. La Oct-4 ayuda a encender o apagar genes en el momento indicado, lo cual es parte importante en el proceso de diferenciación celular y desarrollo embrionario.³⁸

Las células troncales expresan los siguientes marcadores:

Tabla 1. Marcadores de superficie (Ref.³⁹⁻⁴¹)

Nombre del marcador	Tipo celular	Significado
Cluster designation 30 (CD30)	Célula troncal embrionaria	Esta molécula es un receptor de superficie encontrado especialmente en células troncales pluripotenciales.
Teratocarcinoma-derived growth factor-1 TDGF-1	Célula troncal embrionaria	Gen de un factor de crecimiento expresado por células troncales embrionarias (ES), ectodermo primitivo y cardiomiocito en desarrollo.

GCTM-2	ES (stem embrionaria)	Proteína de superficie descrita por primera vez en las células de teratocarcinoma y que se expresa también en células troncales pluripotenciales.
Génesis	ES	Factor de transcripción expresado únicamente por células ES durante el estado de indiferenciación.
Germ cell nuclear factor	ES	Factor de transcripción expresado por células troncales pluripotenciales.
Oct-4	ES	factor de transcripción único para células troncales totipotenciales y pluripotenciales, esencial para su establecimiento y mantenimiento.
Stage-specific embryonic antigen (SSEA-1, SSEA-3 y SSEA-4)	ES	Glicoproteína específicamente expresada en el desarrollo embrionario temprano por células troncales pluripotenciales.
TRA-1-60 y TRA-1-81	ES	Proteína de superficie descrita por primera vez en las células de teratocarcinoma y que se expresa también en células troncales pluripotenciales.

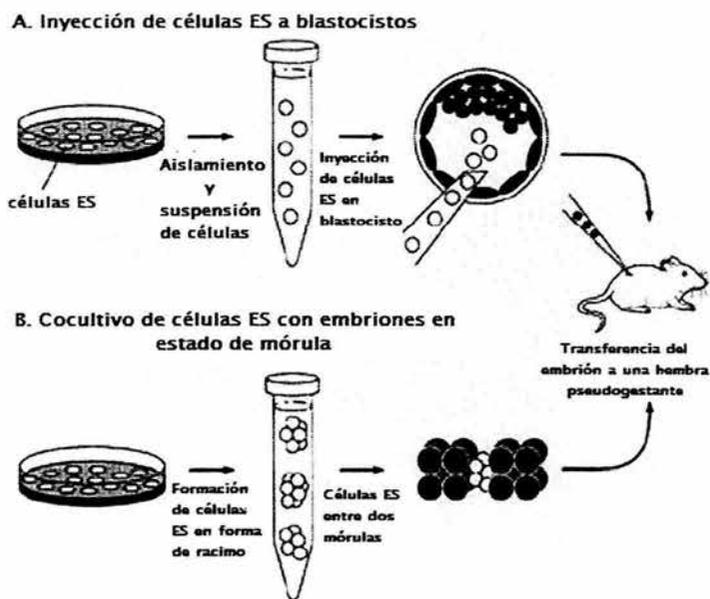
Stem cell factor	ES, células troncales hematopoyéticas (HSC), células troncales mesenquimales (MSC)	Proteína de membrana que intensifica la proliferación de las células ES, las HSC y las MSC.
CD133	Células troncales nerviosas y células troncales hematopoyéticas	Proteína de superficie celular que identifica a las células troncales nerviosas las cuales dan origen a células de la glía y neuronas.
Lineage surface antigen (Lin)	HSC, MSC	Proteína de superficie característica de las células sanguíneas maduras, cuando las células son Lin negativas es un auxiliar para purificar las células HSC.
c-kit	HSC, MSC	Receptor de superficie, presente en las células de médula ósea.
CD34	HSC	Proteína de superficie, que identifica a las células HSC; también identifica a células satélite de músculo y a células troncales de músculo.
Stem cell antigen (Sca-1)	HSC, MSC	Proteína de superficie celular que se encuentra en las células de la médula ósea, ya sean HSC ó MSC.
Thy-1	HSC, MSC	Proteína de superficie, imperceptible en las células HSC.

3. Presentan altos niveles de fosfatasa alcalina intracelular.^{40, 41}
4. Crecen como colonias multicelulares con cariotipos normales y estables, si se examinan los cromosomas al microscopio. Este es un método que permite apreciar si los cromosomas están dañados o si el número de cromosomas ha cambiado, aunque con este método no se pueden detectar mutaciones genéticas finas, es decir, a nivel de la secuencia de ADN de las células.⁴⁰
5. Pueden diferenciarse en cualquiera de las tres capas germinales embrionarias.⁴⁰
6. Forman cuerpos embrioides.⁴⁰
7. Expresan altos niveles de telomerasa y presentan un potencial de crecimiento indefinido.^{40, 41}
8. Se determina si las células pueden subcultivarse después de la congelación, descongelándolas, volviéndolas a sembrar.³³
9. Se puede probar si las células troncales embrionarias son pluripotenciales:
 - a) Permitiendo que las células se diferencien espontáneamente en el cultivo celular.⁴⁰
 - b) Manipulando las células para que éstas se diferencien para formar tipos celulares específicos.⁴³
10. Las células troncales adultas, se cultivan y se manipulan, frecuentemente añadiendo factores de crecimiento o introduciéndoles genes, para determinar en que células diferenciadas pueden convertirse.⁴³

6.4. CARACTERÍSTICAS GENERALES *IN VIVO*

Una de las características más importantes de las células troncales *in vivo* es la capacidad que presentan para formar animales quiméricos, éstos son producidos, inyectando células troncales embrionarias dentro de un blastocisto (Figura 2.A) ó al cocultivar embriones en estado de mórula de ocho células sobre una capa de células troncales embrionarias, después del cocultivo, los embriones con las células troncales embrionarias adheridas se transfieren a medio de cultivo embrionario y se dejan desarrollar al estado de blastocisto, las células troncales embrionarias más tarde formarán parte de todos los tejidos del individuo, incluyendo las líneas germinales (Figura 2.B).²⁷

Figura 2. Reintegración de células ES a embriones en estado de mórula y blastocisto.



- Se muestra como se inyectan las células troncales embrionarias previamente aisladas y cultivadas a un embrión en estado de blastocisto, para después transferir el embrión a una hembra pseudogestante.
- Cocultivo de células troncales embrionarias con embriones en estado de mórula, una vez que se adhieren las células troncales embrionarias a las mórulas se transfiere el embrión a una hembra pseudogestante.

Modificada de:

<http://www.icampus.ucl.ac.be/SBIM2520/document/genemol/administration/etudiants/knockout/knockout.html#ancre728570>

Las células troncales al ser inyectadas vía subcutánea o intraperitoneal en un ratón inmunosuprimido provocan la formación de un tumor benigno llamado teratoma. Los teratomas típicos contienen una mezcla de varios tipos de células diferenciadas o parcialmente diferenciadas, lo que indicaría que las células troncales embrionarias son capaces de diferenciarse en múltiples tipos celulares.⁴³

Se pueden obtener las células troncales adultas de un animal vivo, haciendo el marcaje en un cultivo celular para después transplantarlas dentro de otro animal para determinar si las células troncales pueden repoblar su tejido de origen.⁴³

6.5. ESTRATEGIAS PARA LA OBTENCIÓN

Las células troncales pueden obtenerse de tres fuentes:

I. Embriones

II. Fetos

III. Adultos

I. **Embriones:** En el caso de las células troncales **embrionarias** las cuáles son pluripotenciales, pueden ser obtenidas a partir de mórulas disociadas, en ocasiones se realiza el explante del blastocisto completo, o bien se aísla y cultiva el macizo celular interno aparte.

a. **Mórula:** los embriones en estado de mórula se obtienen haciendo lavados del oviducto con medio Eagle modificado por Dulbecco's (DMEM) el cuál se adiciona con 10% de suero fetal bovino, 10% de suero de becerro recién nacido (Gibco), y 2-mercaptoetanol. Las mórulas compactadas compuestas por aproximadamente 16 células (varía según especie) se lavan tres veces con PBS (solución amortiguadora de fosfatos), la zona pelúcida se remueve por tratamiento con solución de Pronasa al 0.5%, la disociación de las mórulas se lleva a cabo realizando un pipeteo constante de las mismas en una solución de PBS que contiene 0.3% de EDTA, hasta obtener blastómeras totalmente separadas, esto toma aproximadamente tres minutos. Este procedimiento debe ser monitoreado cuidadosamente al microscopio con la finalidad de prevenir un daño a los embriones. Una vez que se obtienen las blastómeras se deben lavar 5 veces con DMEM, y se cultivan en el mismo medio sobre

fibroblastos embrionarios previamente tratados con mitomicina C (células alimentadoras), a 37° C , y entre 10% y 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambia cada dos días.¹⁹

b. **Blastocisto completo:** Se han cultivado los blastocistos intactos en grupos de alrededor de seis embriones en pequeñas gotas de medio de cultivo, debajo de aceite de parafina en cajas de Petri de plástico para cultivo de tejidos por 4 días. Los blastocistos se adhieren en 48 horas y las células del trofoectodermo crecen y se diferencian en células trofoblásticas gigantes. Los macizos celulares internos subsecuentemente se desarrollan en estructuras en forma de huevos cilíndricos grandes, con un grupo de pequeñas células redondas, rodeados por células del endodermo creciendo adheridas a la caja de cultivo. Las estructuras en forma de huevos cilíndricos se extraen de la caja de cultivo para dispersarlas por medio de un tratamiento con tripsina y realizar el pasaje en cajas de Petri previamente tratadas con gelatina la cual contiene fibroblastos STO inactivados con mitomicina C, se utiliza DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 10% de suero de becerro recién nacido. Se deben examinar los cultivos diario y se realiza tripsinación cada 2 o 3 días, para obtener subcultivos.¹⁵

c. **Macizo celular interno:** Para obtener el macizo celular interno se utiliza lo que se llama inmunocirugía, la cuál consiste en la destrucción mediada por el complemento de las células del trofoblasto utilizando un anticuerpo que se une a dichas células, se ha utilizado para este fin un antisuero de conejo contra las células BeWO (línea celular derivada de coriocarcinoma humano), el macizo celular interno puede ser separado fácilmente de los remanentes de

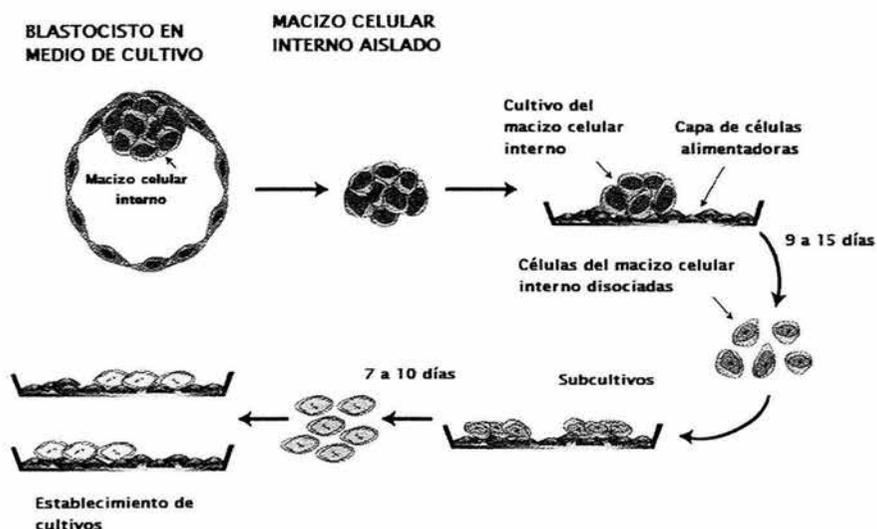
las células trofoblásticas, para después colocar a las células del macizo celular interno sobre fibroblastos embrionarios de ratón irradiados con rayos gamma, esto con la finalidad de que no se dividan, a esta capa de recubrimiento se le conoce como capa alimentadora (feeder layer); la razón por la que se utiliza la capa alimentadora en el fondo de la caja de cultivo es para darle a las células del macizo interno una superficie pegajosa a la que se puedan adherir, las células alimentadoras también liberan citocinas como LIF al medio de cultivo (Figura 3), recientemente se han empezado a probar otras formas de cultivar células troncales sin el uso de las células alimentadoras de ratón. Esto representa un avance importante debido al riesgo de que virus y otras macromoléculas puedan contaminar a las células troncales cultivadas, por ejemplo, en ocasiones se puede reemplazar la capa alimentadora por LIF (factor inhibidor de la leucemia) o por miembros relacionados con la familia de las IL-6 a la cual pertenece esta citocina. LIF permite la autorrenovación de las células troncales embrionarias de ratón y previene su diferenciación.^{30,43}

El medio de cultivo se prepara con 80% de DMEM formulación alta en glucosa y sin piruvato (Gibco-BRL) suplementado con 20% de suero fetal bovino (Hyclone), 1 mM glutamina, 0.1 mM de mercaptoetanol (Sigma) y 1% aminoácidos no esenciales (Gibco-BRL). Después de 9 a 15 días, los crecimientos producidos por las células del macizo celular interno pueden ser disociados en grupos para la realización de subcultivos, ya sea, por exposición a $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ solución salina buferada libre de fosfato más 1 mM de EDTA, por exposición a Dispasa 10 mg/ml (Sigma), o por disociación mecánica utilizando

una micropipeta. Cada ciclo de subcultivo de las células se conoce como pasaje. Después de 6 meses o más, las células originales del macizo celular interno que en un principio eran alrededor de 30 llegan a producir millones de células troncales embrionarias.³⁰

Las células troncales embrionarias que han proliferado *in vitro* por seis meses o más sin experimentar diferenciación son pluripotenciales y son genéticamente normales y se les conoce como una línea de células troncales embrionarias.⁴³

Figura 3. Método de obtención y cultivo de células ES a partir del macizo celular interno de blastocistos.



Aislamiento y cultivo de células troncales embrionarias obtenidas de embriones en estado de blastocisto.

Modificada de: <http://www.biology.iupui.edu/biocourses/Bio1540/17hes2k2.html>

II. **Fetos:** las células troncales provenientes de fetos llamadas células troncales germinales también son pluripotenciales, estas células se obtienen a partir de la cresta germinal, sitio en donde se está produciendo la diferenciación de la línea germinal, dando origen al óvulo y al espermatozoide.⁴³

Para obtener las células germinales primordiales se debe disgregar mecánicamente la cresta germinal, para después incubar en una solución que contenga 0.05% de tripsina y 0.5 mM de EDTA, o con 0.25% de tripsina a 37° C por 5 a 10 minutos, o bien puede incubarse en una combinación de 0.01% de hialuronidasa tipo V, 0.1% de colagenasa tipo IV y 0.002% de DNasa tipo I a 37° C por dos horas. Las células son cultivadas inicialmente y subsecuentemente se realiza el pasaje sobre una capa alimentadora de fibroblastos embrionarios provenientes de ratón los cuales son por radiación gamma. Las células son cultivadas en DMEM suplementado con 15% de suero fetal bovino, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 0.1 mM de 2-mercaptoetanol, 2 mM de glutamina, 1 mM piruvato de sodio, 100 unidades/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 1000 unidades/ml de LIF, 1 ng/ml de factor de crecimiento para fibroblastos y 10 µM forskolin, los cultivos fueron incubados al 5 u 8% de CO₂, 95% de humedad y se realizan pasajes rutinarios cada 7 días, después de realizar la disgregación con tripsina al 0.25% a 37° C por 5 a 10 minutos.³¹

III. **Adultos:** en el caso de los adultos se han obtenido células troncales provenientes de los siguientes tejidos:

a. **Sangre periférica:** la obtención de células troncales hematopoyéticas a partir de sangre periférica ha venido a sustituir la obtención de células troncales de médula ósea para transplantes en humanos, debido a que es un

procedimiento más sencillo y menos doloroso para el paciente, normalmente en sangre se pueden encontrar una célula troncal por cada 100,000 células circulantes por lo que se debe hacer un tratamiento previo a la extracción, con factores de crecimiento hematopoyéticos y quimioterapéuticos. La administración del factor de estimulación de colonias granulocitarias (G-CSF) ayuda a la movilización de las células troncales de médula ósea, las cuales aparecerán después de 3 a 5 días en la sangre periférica, para obtenerlas se debe hacer una leucoferesis, este procedimiento permite separar las células blancas de la sangre y regresa al torrente sanguíneo el resto de sus componentes, existen en el mercado varios aparatos que llevan a cabo esta acción (CS 3000 Plus de Baxter corporation, AS 104 de Fresenius Hemocare, Inc, etc.), una vez que se realiza la separación (por filtración) de las células blancas, se debe realizar otra selección celular con la finalidad de obtener únicamente las células troncales hematopoyéticas, en la actualidad el método mas utilizado es la selección celular por medio de perlas magnéticas, existen algunos kits en el mercado, para la purificación de células troncales de sangre periférica en humanos, la técnica consiste de los siguientes pasos:^{44,45}

- 1) **Sensibilización:** consiste en la unión de los anticuerpos murinos monoclonales IgG anti CD34 humano que es el marcador de superficie presente en las células troncales hematopoyéticas, es decir, se mezcla el anticuerpo con las células producto de la leucoferesis.^{46,47}
- 2) **Captura:** se debe hacer un lavado con solución salina isotónica para remover los anticuerpos anti-CD34 que no se hayan unido a las células, después se

agrega otro anticuerpo que se encuentra unido a las perlas magnéticas, este es un anticuerpo de borrego anti IgG murino.^{46, 47}

3) **Separación:** se aplica un campo magnético a la cámara que contiene las células lo que permite que los complejos formados por células y anticuerpos sean separados magnéticamente del resto de las células presentes en la suspensión.^{46, 47}

4) **Liberación:** después se drena el contenido de la cámara y se aplica la sustancia liberadora que es una enzima (chymopapain) ésta libera específicamente las células CD34 de las perlas magnéticas quedando la superficie de las células libre de los anticuerpos. Las perlas y los anticuerpos asociados quedan unidos a la cámara por la acción del campo magnético y las células pueden ser recuperadas fácilmente.^{46, 47}

b. Sangre de Cordón umbilical: la obtención de células troncales de la sangre del cordón umbilical se lleva a cabo inmediatamente después del parto, del extremo unido a la madre, mientras la placenta sigue dentro del útero, para drenar la sangre se ejerce presión sobre el cordón y se colecta el contenido en un recipiente estéril el cual contiene CPD-A como anticoagulante. Se deben obtener alrededor de 18 ml de sangre, las muestras se almacenan a temperatura ambiente para procesarlas dentro de las 24-48 horas siguientes.⁴⁸

Para separar las células troncales hematopoyéticas (CD34+) de la fracción de células mononucleares, se debe centrifugar a gradiente con Ficoll, la sangre obtenida del cordón umbilical.⁴⁸

Si se desea purificar una población específica de células troncales hematopoyéticas se pueden utilizar los kits de microperlas magnéticas por ejemplo MiniMacs.⁴⁹

c. **Médula ósea completa:** para obtener las células troncales se realizan lavados de la médula ósea que se encuentra en el fémur, el cuál se obtiene quirúrgicamente del animal para evitar contaminación y así obtener un mayor número de células, las células se suspenden en DMEM enriquecido con 10% de suero fetal bovino, para después realizar una selección del tipo de células que se requiera aislar, existen dos tipos de células troncales que se pueden aislar de la médula ósea: las células troncales hematopoyéticas y las células troncales mesenquimales, la tecnología que se utiliza para separar dichas células es la selección celular por medio de perlas magnéticas antes descrita, lo único que puede llegar a variar es el tipo de anticuerpos que se utilice para marcar las células.⁵⁰

d. **Tejido nervioso:** la sustancia blanca subcortical en el cerebro adulto alberga células progenitoras de la glía, estas células pueden ser aisladas por medio de una selección celular activada por fluorescencia (FACS), ya sea por transfección de proteína verde fluorescente o marcando las células inmunológicamente. estas células dan origen a oligodendrocitos y en menor cantidad también dan origen a neuronas.⁵¹

Para obtener las células troncales de tejido nervioso se ha utilizado la siguiente metodología:

Se debe obtener quirúrgicamente la sustancia blanca subcortical, las muestras obtenidas se disocian para obtener células solas utilizando soluciones de papaina y DNasa, las células se suspenden en DMEM con factor de crecimiento de fibroblastos 20 ng/ml (FGF) sólo ó con neurotrofina 3 (NT-3), 2 ng/ml, factor de crecimiento de plaquetas PDGF (20 ng/ml) se colocan en cajas de cultivo.⁵¹

Las células se lavan y se incuban con anticuerpo anti-A2B5 por 30 a 45 minutos a 4° C, después se lavan 3 veces con PBS que contiene 0.5% BSA y 2 mM EDTA, y se incuban con microperlas unidas a anticuerpos de ratón específicos contra IgM de rata por 30 minutos a 4 °C. Las células A2B5 positivas se lavan y resuspenden para separarlas utilizando columnas de selección positiva.⁵¹

7. BIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS TRONCALES

7.1. BIOLOGÍA

Aquí la investigación básica está desentrañando las moléculas que se envían unas células a otras, y cómo estos "mensajes desde el exterior" ponen en marcha una serie de factores de transcripción para activar genes, cuyos productos ejercen una serie de efectos: reorganización de organelos y macromoléculas, divisiones simétricas y asimétricas, diferenciaciones, etc.^{1, 52}

1) **Controles intrínsecos:** Algunos de los controles intrínsecos incluyen proteínas responsables de establecer las divisiones celulares asimétricas, factores nucleares que controlan la expresión de los genes y modificaciones cromosomales en células hijas troncales o no troncales y relojes internos que de alguna manera les indican el número de veces que deben dividirse antes de diferenciarse totalmente.¹

Durante la división celular asimétrica las dos células hijas pueden adquirir diferente potencial de desarrollo, ya sea, por agregación desigual de los determinantes del destino celular o por influencias diferenciales de su alrededor. Las proteínas estructurales, en particular los componentes del citoesqueleto son importantes para la división de los determinantes del destino celular.⁵²

La proteína INSC (inscuteable) coordina al menos tres aspectos de la división asimétrica de los neuroblastos de *Drosophila*: localización asimétrica de los determinantes del destino celular asociados a membrana, incluyendo

Numb, la localización del mRNA asimétrico y la orientación de los ejes mitóticos, ya se ha identificado el gen *Inscuteable* en humanos y podría estar implicado en la división celular asimétrica de las células troncales neurales.^{52, 53}

Existe evidencia de que los factores de transcripción también controlan el destino de las células troncales. Por ejemplo en la hematopoyesis un gran número de factores de transcripción han sido implicados, uno de éstos es el SCL (stem cell leukaemia) también conocido como Tal-1, el cuál es activado ectópicamente en varios casos de leucemias linfoblásticas de células T y es esencial para la formación de todos los tipos celulares de sangre en el ratón.

Otros factores de transcripción han sido identificados con funciones restringidas en particular para linajes diferenciados. Cada linaje es controlado por combinaciones únicas de factores de transcripción, cada uno de los cuáles puede expresarse individualmente en varios linajes, en algunos casos estas combinaciones implican la formación de complejos físicos.⁵²

Datos recientes han resaltado la importancia de la familia de factores de transcripción Tcf (T-cell factor) y Lef (lymphoid enhancing factor) en la epidermis y el epitelio intestinal. Ratones homocigóticos que carecen del Tcf-4 también carecieron de células troncales en el intestino delgado, mientras que ratones mutantes homocigóticos en Lef-1 presentan defectos en la formación del pelo. La β -Catenina activa la transcripción mediada por Tcf/Lef y es más abundante en las células troncales epidermales, la sobreexpresión de una forma estabilizada de la β -Catenina incrementa la proporción de células troncales *in vitro* e *in vivo* y provoca que los queratinocitos se reviertan a un estado pluripotencial en el cual, éstos pueden diferenciarse en folículos pilosos o

epidermis interfolicular, por el contrario una sobreexpresión de la β -Catenina en el epitelio intestinal de ratones transgénicos estimula la proliferación pero no hay un incremento neto en el número celular, porque hay un incremento correspondiente a la inducción de apoptosis.⁵²

Relojes internos: ¿qué determina el número de veces que la célula sufrirá división antes de experimentar diferenciación terminal?, se ha despertado el interés en el posible papel que juegan los relojes internos que controlan los cambios a nivel de los promotores o inhibidores del ciclo celular, por ejemplo, el inhibidor CDK p27/Kipl (p27) (cyclin dependent kinases p27) se acumula como parte del mecanismo de regulación y limita la proliferación y promueve la diferenciación de las células precursoras de los oligodendrocitos de rata.⁵²

Otro tipo de reloj interno es la **longitud del telómero**: se ha propuesto que conforme la célula se especializa, va acortando sus telómeros, hasta que finalmente llega a la senescencia. De hecho, en la mayor parte de los tejidos adultos no se puede detectar actividad de telomerasa. Por el contrario, las células troncales poseen telómeros largos y actividad telomerasa permanente constitutiva.^{1,43}

La telomerasa es una enzima que mantiene los extremos o terminaciones del cromosoma y se le ha conocido como la enzima que participa en la inmortalización celular. La telomerasa es una enzima transcriptasa reversa ribonucleoproteínica (integrada por ARN y proteínas) que utiliza su componente de ARN (complementario a la cadena sencilla telomérica sobresaliente) como plantilla para sintetizar ADN telomérico directamente en los extremos o terminaciones de los cromosomas. Después de agregar seis

bases, se piensa que la enzima hace una pausa para volver a colocar (translocación) la plantilla de ARN para la síntesis de los siguientes pares de las seis bases repetidas. Esta extensión de la plantilla de la terminación ADN 3' permite la replicación adicional de la terminación 5' de la cadena rezagada, compensando así el problema de replicación de las terminaciones del cromosoma, (ya que con cada replicación celular se pierde parte del ADN telomérico).^{43, 53}

Los telómeros son elementos genéticos esenciales compuestos por repeticiones de ADN y proteínas asociadas. Éstos cubren los extremos de los cromosomas y previenen la fusión de cromosomas y la inestabilidad genética. El ADN telomérico se pierde con cada replicación y por otras causas como por ejemplo la reparación fallida del daño oxidativo del ADN, para compensar esta pérdida los telómeros son alargados por la telomerasa. En la mayoría de las células hematopoyéticas, la actividad de la telomerasa es estrictamente controlada y presente en cantidades limitadas, como resultado, en los leucocitos los telómeros se acortan con el envejecimiento. El acortamiento progresivo de los telómeros eventualmente resulta no sólo en la disfunción del telómero y la apoptosis sino que también en la promoción de la inestabilidad cromosómica. El acortamiento de los telómeros representa un mecanismo supresor tumoral en los mamíferos y limita el crecimiento de casi todas las células troncales y linfocitos.^{43, 54}

Los telómeros de los cromosomas lineares consisten, en todos los vertebrados, de una secuencia repetida de TTAGGG/CCCTAA y proteínas asociadas. La longitud de las repeticiones varía entre los cromosomas y entre

las especies, en humanos la longitud de las repeticiones del telómero va de 2–15 pares de kilobases dependiendo del tipo de tejido, la edad y la historia replicativa de las células.^{43, 54}

Los telómeros previenen que las terminaciones de los cromosomas lineales presenten rupturas en la estructura del ADN y protegen las terminaciones cromosómicas de degradación y fusión, también juegan un papel dentro de la meiosis y la organización de los cromosomas dentro del núcleo.⁴³

2) **Controles externos:** Las señales externas que controlan el destino de las células troncales construyen colectivamente el microambiente o nicho de las mismas. Este nicho es importante tanto para tejidos con asimetría poblacional y para aquellos con asimetría constante, implicando una compleja interacción de señales de corto y largo alcance entre células madre, sus hijas, y las células vecinas:⁵²

Factores secretados: El concepto de nicho fue primariamente descrito en la hematopoyesis, donde existen sistemas que sostienen la proliferación, diferenciación y la sobrevivencia de diferentes poblaciones progenitoras *in vitro*, las cuáles se descubrió que dependían de factores secretados por otros tipos de células. En este sistema la función primaria de los factores secretados parece ser selectiva, para prevenir la muerte de progenitoras comprometidas con un linaje en especial. Por otra parte, los factores secretados juegan un papel instructivo en la diferenciación de las células troncales de la cresta neural.⁵²

Un amplio rango de factores secretados regulan la proliferación y destino de las células troncales. Se mencionan cuatro familias de factores secretados, la familia de TGF β (Transforming growth factor), citocinas del tipo de la IL-6 (Interleucina 6), Hedgehog y la familia de Wnt, que presentan una conservación funcional notable entre las especies y entre los tejidos que se autorrenuevan a través de divisiones asimétricas o asimetría poblacional.⁵²

Las proteínas de la familia Hedgehog son glicoproteínas de secreción que activan un complejo receptor membranario, lo que se traduce en una señalización citoplasmática que activa los factores de transcripción Gli, esta vía de señalización ha sido el centro de atención recientemente, la acción positiva de esta vía de señalización está estrictamente regulado por varios inhibidores a diferentes niveles.⁵⁵

Por ejemplo, la señalización por Hedgehog (Hh) activa un complejo receptor que está formado por Patched (Ptc) y Smoothened (Smo). Shh (Sonic Hedgehog) inhibe a Ptc, el cual cuando está encendido inhibe normalmente a Smo, la inhibición de Ptc por Hh activa la vía de señalización de Shh y resulta en la actividad de Gli. La función de Ptc y otros inhibidores, es silenciar la señalización en la ausencia de ligandos Hh activos. Esto implica que la señalización mediada por Hh-gli debe estar apagada la mayor parte del tiempo y sólo activarse en momentos precisos y localizaciones en las cuales las señales de Shh actúan.⁵⁵

En los mamíferos existen tres miembros conocidos de la familia Hedgehog, que son Sonic, Desert e Indian Hedgehog, varios experimentos los han relacionado en el desarrollo de varios tejidos y órganos, incluyendo piel,

pulmón, cerebro, hueso y sangre. Shh es el más ampliamente expresado, aparentemente el más potente, se conoce que en la médula espinal juega un papel esencial al inducir la diferenciación de varios tipos de neuronas y células de la glía.^{55, 56}

Las proteínas Gli son factores de transcripción multifuncionales y sus actividades están intrincadamente regulados. Se pueden encontrar en el núcleo ó en el citoplasma, donde hay componentes de un complejo multimolecular que está unido al citoesqueleto. El estado de señalización Shh afecta directamente el destino de las proteínas Gli.⁵⁵

La señalización formada por el complejo formado por Shh-Gli parece regular varios procesos celulares, por el momento se conoce que puede regular la sobrevivencia de células no diferenciadas y diferenciadas, induce la diferenciación de la placa ventral del tubo neural en desarrollo e induce la proliferación de precursores neuronales dentro del cerebelo en desarrollo.⁵⁵

La familia de Wnt activa la transcripción por un complejo camino que involucra a la β -catenina; la importancia de este camino ha sido establecida en mamíferos dentro de la epidermis y el epitelio intestinal aunque la fuente de Wnt en éstos tejidos aún no se conoce, también se ha involucrado a esta familia en numerosos eventos del desarrollo animal incluyendo la proliferación de células troncales y la especificación de la cresta neural.^{52, 57}

Al menos dos miembros de la familia de **proteínas de señalización TGF β** son importantes para la regulación de la diferenciación de las células troncales de la cresta neural, en *Drosophila*, el TGF β pertenece a la familia de las citocinas, se ha demostrado que el TGF β es un regulador de todos los estados

de la hematopoyesis, dependiendo del estado de diferenciación de la célula blanco, el microambiente local y la concentración de TGF β , éste puede actuar como regulador positivo o negativo de la proliferación, apoptosis o diferenciación de las células hematopoyéticas.^{52, 58}

La citocina IL-6 y citocinas relacionadas, tales como la IL-11 (Interleucina 11), LIF (leukaemia inhibitory factor), OSM (oncostatin M), CNTF (ciliary neurotrophic factor) CT-1 (cardiotrophin), son una importante familia de mediadores involucrados en la regulación de la respuesta aguda a daño o infección, además de sus funciones en la respuesta inflamatoria e inmune, éstas citocinas juegan un papel importante dentro de la hematopoyesis, regeneración neuronal y del hígado, desarrollo embrionario y fertilidad.^{59, 60}

Interacciones célula-célula mediadas por proteínas integrales de membrana: Otras señales que controlan el destino de las células troncales requieren contacto directo célula-célula. A pesar de que la β -catenina es un componente estructural de las uniones adherentes, se conoce poco acerca de la adhesión intercelular como mecanismo regulador de las células troncales. Un ejemplo, de la señalización local que requiere contacto célula-célula es el receptor Notch y su ligando Delta, ambos son proteínas transmembranales.⁵² La señalización de Notch en células troncales epidermales promueve la diferenciación celular a diferencia de otras poblaciones celulares donde tiene el papel de supresor.⁶¹

Integrinas y matriz extracelular: La adhesión a la matriz extracelular es mediada por varias clases de receptores, los más extensamente caracterizados son las integrinas. Una alta expresión de integrinas β 1 se requiere para el mantenimiento de las células troncales epidermales y regulan la diferenciación

de los queratinocitos y otros tipos de células a través de la señalización por MAP cinasas. Las integrinas mantienen a las células en el lugar correcto dentro de un tejido y una pérdida o alteración en la expresión de éstas proteínas asegura la salida de las células troncales del nicho hacia la diferenciación o apoptosis, también son receptores de señalización y pueden activar directamente receptores de factores de crecimiento. Las proteínas de la matriz extracelular pueden modular la expresión y activación de las integrinas $\beta 1$ y la variación local en la composición de la membrana basal podría jugar un papel en el establecimiento y mantenimiento de la distribución de las células troncales epidermales. Finalmente, la matriz extracelular potencialmente puede secuestrar y modular la concentración local de los factores secretados disponibles dentro del nicho de las células troncales.⁵²

Controles Homeostáticos: en su concepto original, el modelo del nicho planteaba que cuando una célula troncal se dividía, sólo una célula hija permanecía en el nicho y la otra debía diferenciarse a menos que existiera otro nicho disponible. En los tejidos con divisiones asimétricas constantes es fácil observar como la salida del nicho se logra a través de la orientación de los ejes mitóticos. De cualquier manera en las poblaciones de células troncales del tipo regulatorio, la idea de la competencia por el nicho es indudablemente una simplificación. Por ejemplo, cuando células troncales hematopoyéticas son transplantadas de un ratón a otro, el fenotipo del injerto se determina simplemente por la relación de las células troncales del hospedero con las del donador, lo cual sugiere que no hay necesidad de reducir la reserva de células troncales del hospedero para hacer espacio para las nuevas células troncales

transplantadas.⁵²

La regulación del número de células troncales depende en parte de retroalimentación positiva y negativa que se ha conservado a través de la evolución. Los mecanismos de retroalimentación podrían involucrar factores de transcripción específicos inducidos en respuesta a señales externas o a los efectos antagonistas de diferentes señales externas.⁵²

7.2. PAPEL EN LA RENOVACIÓN CELULAR

En reportes recientes se ha descrito que desde la vida perinatal a la adulta van apareciendo células troncales en los tejidos somáticos, como parte de la estrategia del organismo para su renovación en condiciones fisiológicas o ante un daño. Con esto se llegó a la conclusión aparentemente paradójica de que en realidad las células troncales de adulto no son células primitivas derivadas directamente del embrión temprano, sino que son células que aparecen más tarde ya especializadas en poder suministrar células de repuesto al organismo adulto.¹

Hace más de 30 años, Altman y Das descubrieron que dos regiones del cerebro, el hipocampo y el bulbo olfativo de las ratas adultas, contenían células en división que se convertían en neuronas. A pesar de éstos reportes, en ese entonces se creía que las células nerviosas en el cerebro adulto no se dividían.⁶²

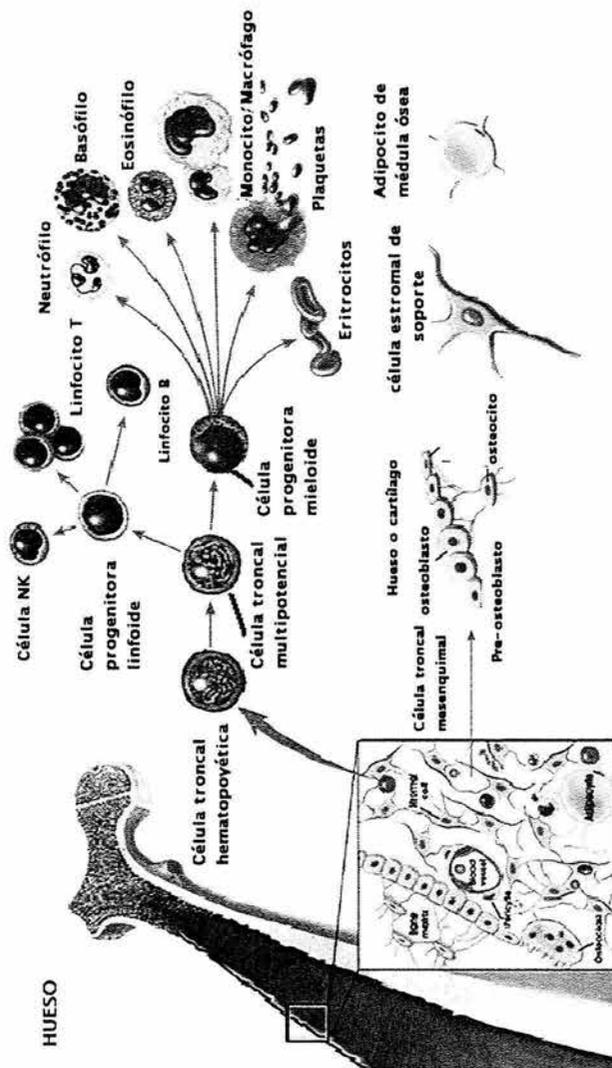
Algunos experimentos de finales de los noventa apoyaron esta teoría, debido a que se descubrió que las células troncales existentes en el cerebro anterior de los mamíferos participaban en la repoblación del subepéndimo del ventrículo después de haberlo sometido a irradiación generando neuronas *in vivo*, dichas células al ser cultivadas en el laboratorio presentaron la habilidad de formar neuroesferas, que es un agrupamiento de células no diferenciadas, al ser disociadas se diferenciaron en neuronas y células de la glía, por otra parte se encontró que en los roedores las células epéndimales que se encuentran en la zona ventricular, actúan como células troncales neurales debido a que son fuente de nuevas neuronas que migran hasta el bulbo olfativo.^{63, 64}

Otros ejemplos del papel que desarrollan las células troncales adultas dentro de la renovación celular de los tejidos, son:

Las **células troncales mesenquimales** se encuentran localizadas en el estroma de la médula ósea, su papel es contribuir a la regeneración de los tejidos mesenquimatosos (hueso, cartílago, músculo, ligamento, tendón, tejido adiposo y estroma). Ya se ha logrado aislar y cultivar las células troncales mesenquimales, además se ha realizado la diferenciación controlada de las mismas hasta células con rasgos típicos de osteocitos, condrocitos o adipocitos (Figura 4).³²

Las **células troncales hematopoyéticas**, dan origen a todos los tipos de células sanguíneas como son los eritrocitos, linfocitos B, linfocitos T, Células NK, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos y plaquetas, y se ha demostrado que una sola célula troncal hematopoyética es capaz de reconstituir por tiempo indeterminado el sistema linfohematopoyético (Figura 4).⁶⁵

Figura 4. Diferenciación de las células troncales de la médula ósea



En esta figura se muestra la diferenciación que experimentan las células troncales de médula ósea y su papel dentro de la renovación celular.

Modificado de: <http://stemcells.nih.gov/infoCenter/stemCellBasics.asp>

Las células troncales epiteliales del tracto digestivo que se encuentran en las criptas profundas y dan origen a varios tipos de células: células de absorción, células caliciformes, células enteroendócrinas, etc.⁶⁶

Algunos estudios han sugerido una distribución y organización compleja de las células troncales que se encuentran en la piel, las cuales se localizan específicamente en la epidermis interfolicular, en la región superior de la vaina de la raíz externa del folículo piloso, también conocida como la región del "bulge" y en la matriz germinal de los folículos pilosos activos, la relación entre estos tres tipos de células troncales de la piel aún no ha sido esclarecida, aunque existe la hipótesis de que las células troncales de la región del "bulge" representan la más potente población de reserva de células troncales y son capaces de formar varias estructuras de la piel contribuyendo en la producción de las células de las glándulas sebáceas, las células del folículo piloso y la epidermis.^{67, 68}

Una sola célula troncal adulta, debería ser capaz de generar una línea de células genéticamente idénticas, conocidas como clonas (autorrenovación), las cuales entonces darán origen a todos los tipos de células apropiadamente diferenciados de un tejido. Recientemente se ha descubierto que clonas de células troncales adultas tienen la habilidad de repoblar tejidos dañados en un animal vivo.^{33, 56}

7.3. PLASTICIDAD

No existe una definición oficial para la plasticidad de las células troncales adultas, se ha sugerido que ciertas células troncales adultas específicas de un tejido o precursoras de un linaje, pueden bajo ciertas condiciones microambientales adquirir la habilidad de dar origen a células especializadas de otros tejidos o pertenecientes a otro linaje, lo cual se conoce como transdiferenciación o plasticidad.^{1,43}

esta definición implica que:

- Se pueden derivar diferentes linajes celulares de una célula inicial
- Todas las células diferenciadas son funcionales *in vitro* e *in vivo*
- Al realizar implantes, las células persisten en la presencia y ausencia de tejido dañado.

Este criterio puede utilizarse para evaluar los estudios que han descrito la plasticidad de las células troncales. La mayoría de los estudios se han realizado en modelos murinos y muy pocos estudios han demostrado la plasticidad de células troncales en humanos. Muchos de los estudios se han basado en el trasplante *in vivo* de células marcadas con proteína verde fluorescente o β -galactosidasa, y la detección de las células del donador se basaron en la presencia del marcador utilizado.⁴³

Esto pone en duda la idea errónea que hasta hace poco se tenía, de que el potencial de desarrollo de las células troncales de un tejido estaba restringido a dar origen solamente a las células diferenciadas del tejido en el que residen.¹

Se mencionan 4 teorías probables de la plasticidad:⁴³

1. Múltiples células troncales específicas de un tejido pueden estar presentes en otros órganos.⁴³
2. La plasticidad es el resultado de la fusión de las células troncales provenientes de un donador con las células troncales residentes de un órgano.⁴³
3. Las células troncales pueden experimentar desdiferenciación o rediferenciación.⁴³
4. Verdaderas células multipotenciales o pluripotenciales persisten en la vida postnatal.⁴³

1. **Múltiples células troncales específicas de un tejido pueden estar presentes en otros órganos:** Se ha demostrado que las células troncales hematopoyéticas salen de médula ósea, circulan en la sangre periférica y se establecen en diferentes órganos, este concepto se ha utilizado clínicamente para trasplantes a partir de sangre periférica.⁶⁹

Por consiguiente, las células troncales podrían encontrarse en otros órganos. Este parece ser el caso para el tejido muscular, ya que dos estudios han mostrado que el sistema hematopoyético puede ser repoblado después de transplantar células musculares en ratones irradiados subletalmente, ya que el tejido muscular transplantado contenía células troncales que en origen eran hematopoyéticas.^{43,70}

Otro ejemplo, es que la médula ósea contiene células con características de células ovales, que son las progenitoras de las células epiteliales hepáticas y biliares.⁷¹

2. **La plasticidad es el resultado de la fusión de las células troncales provenientes de un donador con las células troncales residentes de un órgano:** El concepto de que la fusión celular puede cambiar el destino de las células no es nuevo. Varios experimentos han mostrado que el destino de una célula puede cambiarse con la formación de heterocariones. Por ejemplo, la fusión de un mioblasto con un fibroblasto induce a la expresión de proteínas musculares por los fibroblastos. Esto indica que el citoplasma de los mioblastos contiene factores que inducen la diferenciación muscular de células no musculares. Dos estudios recientes documentan que el cocultivo de tejido adulto con células troncales embrionarias provoca la fusión celular. Aunque varios estudios *in vitro* han mostrado que es posible que el linaje celular cambie sin la necesidad del cocultivo de células troncales de adulto con células troncales embrionarias u otro tipo de células. Ninguno de los estudios hasta la fecha pueden excluir formalmente la posibilidad de la fusión celular *in vivo* para producir el fenómeno de plasticidad. Sin embargo, puede ser posible que este mecanismo dé origen a la plasticidad bajo situaciones extremas como falla aguda del órgano o muerte tisular.⁴³

3. **Las células troncales pueden experimentar desdiferenciación o rediferenciación:** En la era de la oveja Dolly se dio a conocer que la información genética de una célula puede ser reprogramada, y que las

células somáticas pueden desdiferenciarse para volverse células troncales pluripotenciales.^{43, 72}

Se conoce desde hace tiempo que la desdiferenciación y la rediferenciación ocurren en anfibios como el Urodeles, el cual puede regenerar completamente sus miembros. Algunos estudios sugieren que un proceso similar aunque menos drástico ocurre en la desdiferenciación de las células somáticas. Por ejemplo cuando las células progenitoras de los oligodendrocitos provenientes del nervio óptico son cultivadas en medios libres de suero y de baja densidad, las células adquieren características de células troncales neurales.⁷³ Otros estudios han sugerido que las células comprometidas con la producción del epitelio pancreático pueden cambiar al fenotipo hepático aunque las propiedades funcionales de dichas células no han sido definidas.⁴³ Estos hallazgos sugieren que la desdiferenciación y la rediferenciación podrían ser una tercera explicación a la plasticidad de las células troncales de adulto. Por lo que las células troncales de adulto o células progenitoras serían reprogramadas cuando se mueven de su microambiente usual y se les introduce a un nicho diferente que les presenta señales para activar el programa genético requerido para el nuevo destino de la célula.⁵⁶

Explorar los mecanismos moleculares que rodean la reprogramación nuclear durante el proceso de clonación podrían ayudarnos en un futuro a comprender la plasticidad de las células troncales adultas.

4. Verdaderas células multipotenciales o pluripotenciales persisten en la vida postnatal: Existe evidencia que sostiene la idea de que células precursoras de ciertas células troncales somáticas pueden persistir mas allá de la

embriogénesis temprana. Suzuki y col., aislaron células del hígado fetal de ratones, las cuales podían expandirse *in vitro* a nivel clonal y reconstituir no sólo células epiteliales hepáticas y biliares sino que también epitelio pancreático y gastrointestinal.⁷⁴ Este experimento demuestra que las células que preceden a las células troncales somáticas conocidas pueden persistir mas allá del desarrollo embrionario.⁴³

Jiang y col., demostraron que las células conocidas como células progenitoras multipotenciales adultas (MAPC) copurificadas con células troncales mesenquimales pueden diferenciarse *in vitro* en células con características de linajes mesodérmicos, neuroectodérmicos y endodérmicos.⁷⁵

Las MAPC pueden contribuir a la formación de la mayoría de los tejidos cuando son inyectadas en un blastocisto. estas células son las únicas en expresar los factores de transcripción Oct-4 y Rex-1 presentes sólo en las células troncales embrionarias, aunque las MAPC sólo los expresan en pequeñas cantidades, aunque no se conoce si las MAPC existen como tales *in vivo* o si son el resultado de una desdiferenciación de células troncales mesenquimales en células con mayor potencial. Actualmente no existe una prueba definitiva de que verdaderas células troncales pluripotenciales existan *in vivo* durante la vida postnatal.⁴³

En los últimos 5 años una serie de reportes han sido publicados sugiriendo el fenómeno de plasticidad en las células troncales de adulto, por lo que éstos han generado gran entusiasmo en la comunidad científica, aunque también cierto escepticismo debido en parte a que la mayoría de los estudios aún necesitan ser confirmados, la baja frecuencia con la que se presenta la

transdiferenciación en las células troncales y más probablemente por que la mayoría de las transdiferenciaci3nes de linaje requieren el establecimiento de la biología de desarrollo y principios básicos de las células troncales.⁴³

Muchos de los estudios han demostrado que células troncales de un tejido específico pueden diferenciarse en múltiples células de diferentes tejidos. Utilizando marcaje con retrovirus muchos estudios han mostrado que las células progenitoras adultas multipotenciales provenientes de médula ósea pueden diferenciarse *in vitro* en células del mesodermo, neuroectodermo y endodermo. En estudios *in vivo* se ha encontrado que las células obtenidas pueden diferenciarse en células diferentes al tejido de origen.⁴³

Krause y col., mostraron que las células troncales hematopoyéticas no sólo pueden dar origen a su progenie que restablece el sistema hematopoyético sino que también pueden encontrarse en algunas ocasiones en epitelio del hígado, intestino, pulmón y piel, donde éstas adquieren morfología y fenotipo, pero no las funciones características de estos tejidos epiteliales.⁷⁶

Grant y col., realizaron transplantes de células troncales hematopoyéticas en modelos murinos letalmente irradiados y dichas células no sólo dieron origen a células hematopoyéticas sino que también a células endoteliales de los vasos sanguíneos de la retina los cuales habían sido previamente dañados. En contraste con los estudios de Krause y col., los estudios de Grant y col., también prueban diferenciación funcional, ya que el flujo sanguíneo fue recobrado en la retina dañada.⁷⁷

Clarke y col., mostraron en sus estudios que el potencial de diferenciación de las células troncales en los tejidos de adultos, no estaba limitado sólo al linaje celular del órgano en el que residían sino que también presentan un gran repertorio de diferenciación, en su experimento demostraron que las células troncales neurales del cerebro adulto de ratón pueden contribuir a la formación de embriones quiméricos de ratón y pollo, dando origen a células de todas las capas embrionarias. Esto demostró que una célula neural de adulto tiene una gran capacidad y podrán ser potencialmente utilizadas para generar una variedad de tipos celulares para su trasplante en varias enfermedades.⁷⁸

Bjornson y col., irradiaron ratones subletalmente con la finalidad de destruir su línea hematopoyética, después fueron inyectados sistémicamente con células troncales nerviosas marcadas genéticamente (gen lacZ). Después del trasplante, los ratones produjeron células sanguíneas de los dos sublinajes, mieloide y linfoide, así como células hematopoyéticas inmaduras.^{36, 79}

Eglitis y col., inyectaron células troncales de la médula ósea en el torrente circulatorio de ratones irradiados, se demostró que dichas células colaboraron en la formación de células de la microglía y astrogliá en varias regiones del cerebro, así como también dieron origen a nuevas células músculo-esqueléticas en la región tibial anterior donde las células habían sido inducidas a degenerar, y nuevas células ovales hepáticas las cuales son precursoras de células hepáticas diferenciadas.^{36,80}

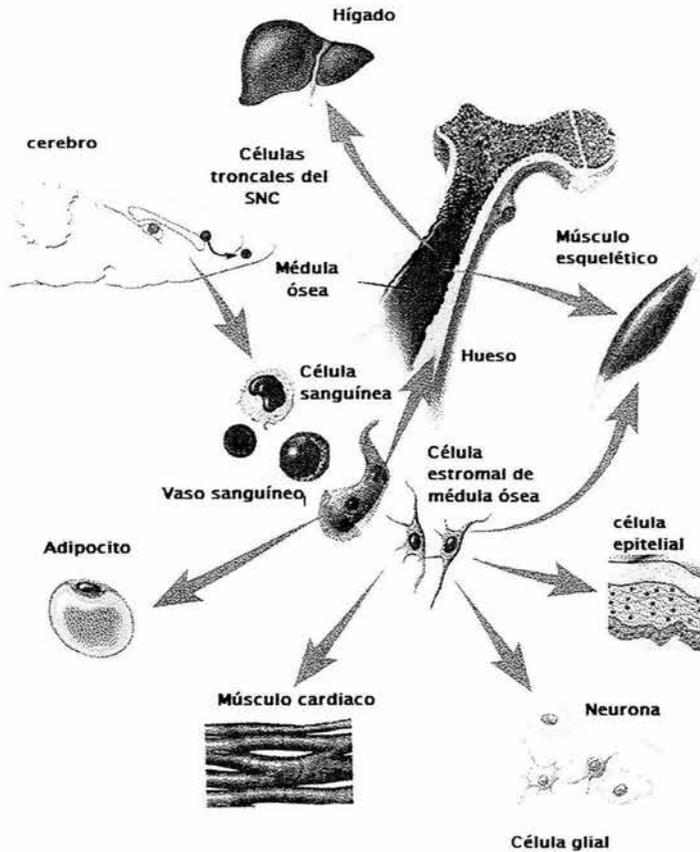
El grupo de Peterson usando ratones, hizo trasplantes de médula ósea de machos a hembras singénicas (para identificar a las células usaron el gen sry del cromosoma Y como marcador) y dañó el hígado de los ratones receptores

para estimular su regeneración, con lo cual lograron apreciar células ovales hepáticas procedentes del donante, lo que sugirió que en la médula ósea existen células troncales con el potencial de generar células epiteliales de hígado.⁸¹

Como conclusión de todos los experimentos citados podemos decir, que una célula troncal nerviosa (ectodermo) puede dar lugar a linaje sanguíneo (mesodermo), o células madre de la médula ósea (mesodermo) pueden originar células hepáticas (endodermo); lo cual es una auténtica sorpresa porque pone en entredicho un dogma asentado de la embriología, el que dice que el destino de una célula queda sellado cuando entra a formar parte de una de las capas embrionarias (Figura 5).¹

Debido a que la plasticidad de las células troncales puede ser causada por procesos de dediferenciación y rediferenciación, los estudios dirigidos al entendimiento de los mecanismos genéticos que rodean éstos procesos serán invaluable. Por lo que un mejor entendimiento de los factores que gobiernan el proceso de plasticidad deberían mejorar los métodos que inducen la dediferenciación y rediferenciación, lo cuál haría a este fenómeno clínicamente más relevante.⁴³

Figura 5. Plasticidad de las células troncales de adulto



En el esquema se representa como células de un linaje pueden dar origen a células de linajes diferentes.

Modificada de: <http://stemcells.nih.gov/infoCenter/stemCellBasics.asp>

8. USOS ACTUALES Y POTENCIALES DE LAS CÉLULAS TRONCALES

8.1. TERAPIAS CELULARES Y TRANSPLANTES

Existen varias maneras en las cuales las células troncales pueden ser utilizadas dentro de las áreas de investigación básica y clínica. Aunque existen varios obstáculos que hay que superar antes de explotar los usos potenciales de las mismas. El estudio de las células troncales ha ayudado a obtener información acerca de los complejos eventos que ocurren durante el desarrollo de los organismos superiores, se han utilizado para probar nuevos fármacos, para conocer las señales que controlan la diferenciación de las células troncales, pero tal vez una de las aplicaciones más importantes de las células troncales es la generación de células y tejidos que pueden ser utilizados en terapias y transplantes. Las células troncales podrían ser manipuladas para diferenciarse en tipos específicos de células, ofreciendo la posibilidad de una fuente renovable para células de reemplazo y tejidos para el tratamiento de enfermedades como el Parkinson, Alzheimer, daño y degeneración del tejido nervioso, diabetes, artritis reumatoide, entre otras.³³

Actualmente el trasplante de las células troncales hematopoyéticas es un tratamiento reconocido para los pacientes que presentan enfermedad severa, ya sea, hereditaria o adquirida del sistema hematopoyético. El objetivo de dicho trasplante es reemplazar, transitoria o permanentemente, parcial o completamente, un sistema hematopoyético lesionado o enfermo. El nuevo

sistema hematopoyético puede ejercer la función deficiente o ausente hasta momentos antes del trasplante, proporcionar un producto del metabolismo faltante, o poner bajo control, junto con otros esquemas una enfermedad gracias a la competencia inmunitaria.⁴⁴

El trasplante de células troncales hematopoyéticas se está realizando como parte del tratamiento en enfermedades congénitas, anemia aplásica, leucemias, enfermedades linfoproliferativas, tumores sólidos y enfermedades autoinmunes severas refractarias al tratamiento, aunque antes de tomar la decisión de llevar a cabo un tratamiento con células troncales se deben tomar varias consideraciones, como las complicaciones que se pueden presentar antes y después de realizar el trasplante.^{44,82}

Las células troncales hematopoyéticas pueden obtenerse principalmente de médula ósea, sangre periférica, y en ocasiones de sangre del cordón umbilical.^{44, 83}

Uno de los primeros usos clínicos de las células troncales hematopoyéticas fue para el tratamiento de neoplasias sanguíneas, principalmente la leucemia aguda y la leucemia mielocítica crónica, que generalmente son el resultado de una proliferación no controlada de leucocitos; en el caso de la leucemia mielocítica crónica además de un alto conteo leucocitario existe la presencia de una anomalía citogenética de las células troncales contenidas en la médula ósea producida por una translocación en el oncogén Abelson, las células troncales hematopoyéticas que se utilizan para el trasplante son obtenidas de un donador cuyos antígenos leucocitarios humanos (HLA) son idénticos o lo más parecido posible a los del paciente. El sistema de los HLA es heredado en 6

cromosomas y lo ideal es que el donador sea un HLA idéntico, generalmente un hermano o hermana del paciente, aunque ésto no siempre es posible y en ocasiones el donador puede ser un HLA compatible aunque no esté relacionado con el paciente o bien se pueden utilizar células troncales de cordón umbilical.⁸⁴

Se menciona que los trasplantes también pueden ser autólogos, las células del paciente son obtenidas y preservadas antes del tratamiento con quimioterapia o radioterapia y una vez que se ha dado por terminado el tratamiento y los residuos del mismo son desechados por el organismo las células del paciente vuelven a reintroducirse, este tipo de trasplante se ha utilizado para reemplazar las células sanguíneas dañadas por la quimioterapia, ya que ésta ataca a las células que presentan división celular rápida, aunque lo más recomendable es que los trasplantes sean alogénicos, ya que ofrecen más ventajas: la seguridad de un trasplante libre de contaminantes como células neoplásicas, se ha demostrado que los productos de la leucoferesis de pacientes con cáncer de seno, mieloma múltiple y linfoma pueden contener cantidades significantes de células neoplásicas, lo cual puede provocar una recaída del paciente, ésto se puede evitar obteniendo purificados, ya sea de sangre periférica o médula ósea que contengan únicamente células CD34+ Thy-1+, aunque otra de las ventajas de los trasplantes alogénicos es lo que recientemente se ha descrito como efecto trasplante *versus* leucemia, que está relacionado con la actividad antitumoral mediada por células inmunitarias contenidas en el trasplante de células troncales del donador.^{44, 85}

Desarrollo del trasplante

El trasplante o terapia con células troncales se desarrolla en varias fases:⁴⁴

I. Acondicionamiento

II. Obtención de las células troncales hematopoyéticas

III. Aceptación del trasplante

IV. Restablecimiento de la hematopoyesis

I. Acondicionamiento

Es la fase de preparación antes de recibir el trasplante y consta de dos objetivos:

1. Reducción o eliminación de la enfermedad problema (Ej.: leucemia)
2. Inmunosupresión del paciente para evitar el rechazo del trasplante

La intensidad del acondicionamiento es realizada según la naturaleza y el estado de la enfermedad, los factores de riesgo y el grado de histocompatibilidad, el acondicionamiento no es necesario en caso de déficit inmunitario severo o en caso de trasplante idéntico, mientras que un acondicionamiento intensivo es necesario en casos de leucemia avanzada o trasplante histoincompatible.⁴⁴

Generalmente para las leucemias se administra ciclofosfamida e irradiación de todo el cuerpo ó ciclofosfamida y busulfan; para el caso de linfomas y neoplasias sólidas, consiste en quimioterapéuticos combinados; para los mielomas se usa melfalan; para las anemias aplásicas y las enfermedades autoinmunes se usa ciclofosfamida e inmunoglobulinas anti-linfocitos T.

Un acondicionamiento de baja intensidad se basa comúnmente en una combinación de fludarabine con ó sin inmunoglobulina anti-linfocitos T e irradiación de baja intensidad de todo el cuerpo ó quimioterapia en dosis muy pequeñas.⁴⁴

II. Obtención de las células troncales hematopoyéticas

Las células troncales hematopoyéticas para el trasplante pueden obtenerse de: **Médula ósea**, la obtención de médula ósea de un donador debe ser realizada en un quirófano donde el donador es sometido a anestesia epidural o general y múltiples aspirados son realizados en la parte posterior de la cresta ilíaca para colectar una cantidad suficiente de células de médula ósea. Se pueden obtener alrededor de 500 a 1500 ml de contenido en humanos. En muy raras ocasiones han existido muertes relacionadas con complicaciones asociadas con la anestesia general durante el procedimiento; por otro lado en los pacientes que reciben anestesia epidural las complicaciones pueden ser dolores de cabeza y acumulación de líquido en la zona epidural. Pueden existir otras complicaciones que incluyen infecciones bacterianas locales o sistémicas originadas en el sitio de colección, daño del nervio ciático por una punción inadecuada y contusiones.⁴⁴

Con la nueva tecnología, ya no es necesario obtener las células troncales hematopoyéticas de la cavidad de la médula ósea, la fuente alternativa es la **sangre periférica**. El donador del cual se obtendrán las células troncales de sangre periférica debe ser sometido a un tratamiento con el factor estimulante de las colonias de granulocitos o G-CSF. Como ya se mencionó en los métodos de obtención, este factor promueve la movilización de las células troncales de la

médula ósea, apareciendo éstas en circulación de 4 a 5 días después del tratamiento, desafortunadamente con la administración del G-CSF algunos donadores desarrollan fiebre, dolores óseos y una gran leucocitosis, por lo que someter a los donadores a este tratamiento debe ser considerado.⁴⁴

Las células troncales hematopoyéticas para el trasplante son administradas al paciente por vía intravenosa, y éstas encuentran su camino hacia la médula ósea gracias a unos receptores denominados "homing receptors". Una vez que se localizan en la médula ósea las células troncales hematopoyéticas comienzan a dividirse, la reconstitución de los conteos sanguíneos requiere alrededor de 2 a 4 semanas para los eritrocitos, trombocitos y granulocitos; para la reconstitución inmunitaria se requiere más tiempo. La enfermedad trasplante contra paciente ó mejor conocida como Graft *versus* Host disease (GvHD) puede retardar la recuperación inmunitaria durante años.⁴⁴

La enfermedad GvH es una de las mayores complicaciones después de un trasplante alogénico, ya sea de médula ósea o de células troncales hematopoyéticas de sangre periférica. Esta enfermedad se presenta cuanto los linfocitos T reactivos del donador presentes en el trasplante reconocen como extraños antígenos principales y de menor importancia de histocompatibilidad en los tejidos del paciente ó receptor, también existe la activación de células inflamatorias efectoras, así como la secreción de moléculas citopáticas (citocinas como el factor de necrosis tumoral, TNF), las cuales inducen lesiones en piel, tracto gastrointestinal, hígado, pulmón y sistema inmune. A pesar de que la enfermedad GvH puede tener complicaciones graves, hay un aspecto

positivo, debido a que mientras los linfocitos T del donador atacan los tejidos del paciente, también atacan frecuentemente a las células neoplásicas residuales. Esto se observó por primera vez en la leucemia aguda y a éste fenómeno se le conoce como Graft *versus* Leukemia ó transplante contra la leucemia (GvL), actualmente también se observa en otros tipos de neoplasias de tumores sólidos.^{44,86}

III. Aceptación del transplante

La siguiente fase dura hasta la aceptación del transplante, su desarrollo se determina día a día según la respuesta de la enfermedad de base o motivo del transplante, el grado de acondicionamiento, la aplasia, la anemia secundaria, la susceptibilidad a las infecciones y el ataque hacia algunos órganos.⁴⁴

IV. Restablecimiento de la hematopoyesis

Esta etapa puede desarrollarse sin problemas o puede marcar el inicio de una larga y difícil fase post-transplante con la presencia de GvHD y complicaciones en algunos órganos, así como infecciones múltiples. Una vez hecho el transplante se debe monitorear al paciente cuidadosamente y se deben llevar a cabo controles anuales que servirán para detectar complicaciones tardías.⁴⁴

Las complicaciones como resultado de un transplante con células troncales hematopoyéticas son frecuentes y a menudo severas, dichas complicaciones pueden agruparse en tempranas que se presentan durante los primeros 100 días post-transplante y las tardías se presentan meses o años después del transplante.⁴⁴

Las complicaciones post-transplante más comunes son las siguientes:

Problemas relacionados con la enfermedad de base, en la fase temprana se relacionan con la toxicidad del tratamiento hacia los órganos y en la fase tardía se relacionan con la recaída del paciente, la mayor parte de las recaídas se manifiestan dentro de los dos primeros años después del transplante, aunque no existe un tiempo límite, pueden pasar años. En los casos de recaída se puede realizar un retransplante ó administrar linfocitos del donador para reforzar el efecto GvL.⁴⁴

Aplasia, la cual puede ser tratada de diferentes formas. La producción deficiente de eritrocitos puede ser compensada con transfusiones, una recuperación tardía puede ser corregida administrando eritropoyetina, la producción deficiente de trombocitos puede ser corregida de igual manera por medio de transfusión de trombocitos, por otra parte el tratamiento paliativo en el caso de la defensa inmunitaria del paciente es más complicado. La prevención de infecciones es fundamental en estos casos, se recomiendan medidas extremas de bioseguridad, así como también la administración de antibióticos para la prevención de las infecciones.⁴⁴

Complicaciones del acondicionamiento, los fármacos que se utilizan para el acondicionamiento actúan de forma fundamental sobre las células en crecimiento, inhibiéndolo o produciendo daño sobre el ADN, lo cual induce a mecanismos de apoptosis o muerte celular afectando a células progenitoras ó troncales de todos los tejidos.⁴⁴

Las complicaciones del acondicionamiento más frecuentes son la aplasia

medular, esterilidad, mucositis y daño de los órganos, la intensidad de la toxicidad está relacionada con la intensidad del acondicionamiento con variaciones individuales.⁴⁴

La **aplasia medular** es consecuencia directa del daño que causan los quimioterapéuticos sobre las células troncales y progenitoras que residen dentro de la médula ósea. La aplasia medular puede ser total, afectando a las células que producen los hematíes, los leucocitos y las plaquetas, ó parcial si se ve afectada solamente una o dos de las líneas celulares.⁸⁷

La **Esterilidad** se debe a que los agentes quimioterapéuticos provocan una alteración de la capacidad para generar espermatozoides (espermatogénesis) que puede llegar a la oligozoospermia (disminución del número de espermatozoides) y esterilidad. Sin embargo, no existe un trastorno asociado a la secreción de hormonas sexuales masculinas, ya que las células de Sertoli y Leydig (células del testículo que producen hormonas masculinas) son bastante resistentes a la acción de la quimioterapia.⁸⁸

En el caso de las mujeres la esterilidad se relaciona con la atrofia del ovario por destrucción folicular, con pérdida del ciclo menstrual transitoria ó definitivamente, dependiendo de la edad de la enferma y la dosis acumulada del citotóxico recibida. Cuando la alteración es definitiva se produce una alteración de los niveles hormonales femeninos hasta niveles parecidos a los que se presentan después de la menopausia. Los síntomas pueden ser igualmente los propios de la menopausia.⁸⁹

La **mucositis** es una inflamación de la mucosa del tracto digestivo y aparece alrededor de una o dos semanas después del inicio del tratamiento con

radioterapia o quimioterapia, es a menudo severa, en ocasiones requiere de tratamiento con opiáceos, además de que vuelve el proceso de alimentación transitoriamente imposible.⁴⁴

El daño en órganos es consecuencia del daño endotelial, como por ejemplo: enfermedad venosa oclusiva del hígado, oclusión de venas intrahepáticas, hemorragia alveolar difusa, cistitis hemorrágica, neumonía intersticial idiopática, lesiones vasculares microangiopáticas. La frecuencia y la severidad de los síntomas es mayor con transplantes alogénicos que con autólogos y son exacerbados por la presencia de GvHD ó infecciones virales, bacterianas o micosis.⁴⁴

Reacciones inmunológicas, el rechazo al transplante es un problema relativamente pequeño, es más frecuente después de un acondicionamiento de baja intensidad, y lo peor que puede pasar en este caso es que el paciente regrese al estado en que se encontraba antes del transplante.⁴⁴

En el caso de que se presente rechazo al transplante después de un acondicionamiento estándar pueden desarrollarse consecuencias severas, ya que sino se vuelve a transplantar al paciente se corre el riesgo de aplasia medular irreversible. La reacción GvH aguda después del transplante es más frecuente y se manifiesta con un estado febril, erupción cutánea localizada o generalizada predominando en las manos, plantas de los pies y rostro, los síntomas gastrointestinales pueden ser diarrea acuosa a sanguinolenta relacionada con el daño a la mucosa intestinal, náuseas, vómito, dolores abdominales e ictericia. Para prevenir la GvHD aguda se utilizan medicamentos inhibidores de la calcineurina (ciclosporina, tacrolimus), metotrexato,

inmunoglobulinas anti-linfocitos T, anticuerpos anti-CD52 ó depleción de linfocitos T. El tratamiento consiste en el uso de esteroides, refuerzo de la inmunosupresión, y de medidas de soporte.⁴⁴

Cuando un trasplante es exitoso no se presentan complicaciones posteriores, por lo que el objetivo de monitorear a los pacientes anualmente es detectar complicaciones tardías siendo la más común la GvHD crónica, las manifestaciones de esta enfermedad pueden variar y pueden ser discretas o extremadamente masivas y severas. Las manifestaciones se concentran principalmente en la piel y las mucosas presentándose resequedad, liquenificación, etc., aunque pueden estar implicados otros órganos, además se pueden presentar síntomas de fatiga, dolores articulares, dolores musculares.⁴⁴ Dentro de los órganos más afectados se encuentra el hígado que puede presentar desde alteraciones leves en pruebas de laboratorio o el síndrome de desaparición del ducto biliar, la bronquiolitis obliterante es la complicación más grave que generalmente provoca la muerte del paciente.⁴⁴

La enfermedad GvH crónica está ligada a un retraso en la reconstitución de la inmunidad y el tratamiento de dicha enfermedad consiste en provocar inmunosupresión por lo que la reconstitución de la inmunidad se retrasa aún más, y el riesgo de contraer infecciones secundarias es mayor por lo que éstas se deben identificar y tratar a tiempo, las infecciones más comunes son las causadas por neumococos, Herpes virus, cytomegalovirus y Aspergillus.⁴⁴

Dentro de los daños a largo plazo ocasionados por el acondicionamiento se encuentran, la esterilidad, las cataratas y la osteoporosis, en niños hay retraso del crecimiento, ausencia del desarrollo de la pubertad entre otros

problemas endócrinos.⁴⁴

Existen ventajas y desventajas del uso de células troncales hematopoyéticas provenientes de sangre periférica o el uso de médula ósea:

Los pacientes transplantados con células troncales provenientes de sangre periférica presentan implantación más rápida de las células troncales en la médula ósea y recuperación hematopoyética más temprana que aquellos a los que se les transplantó médula ósea, aunque en algunos estudios se muestra que la incidencia de la enfermedad trasplante *versus* hospedero (GVH ó Graft versus Host) ya sea, en presentación aguda o crónica, es mayor en los pacientes que han sido transplantados con células troncales de sangre periférica.⁹⁰

Por otra parte se ha demostrado que el trasplante con células troncales hematopoyéticas contenidas en sangre periférica comparado con el trasplante de médula ósea permite una reducción en la recaída de los pacientes después del trasplante esto aunado al mejoramiento del efecto trasplante versus tumor, aunque un incremento en la supervivencia de los pacientes no ha sido demostrado.⁹⁰

Efecto Graft *versus* Tumor

Recientemente los investigadores han reconocido que un efecto antineoplásico puede ser inducido por parte de linfocitos T contenidos en el trasplante de células troncales provenientes de donadores inmunocompetentes en el caso de pacientes afectados con neoplasias sanguíneas. La observación de un menor riesgo de reincidencia en pacientes con leucemia que presentaron el efecto GvH, ya sea de forma aguda o crónica y el resultado que presentaron los pacientes con reincidencia de leucemia

mielógena crónica hacia un estado de cura después de la infusión de linfocitos provenientes del donador del que se obtuvieron las células troncales para el primer tratamiento, confirma lo que se había especulado por años, es decir, la existencia de un efecto antineoplásico inmunomediado por las células del donador, a este efecto se le conoce actualmente como Graft *versus* leukemia.⁹¹

El efecto Graft *versus* tumor que se presenta después del trasplante alogénico con células troncales y es sin duda una de las modalidades más potentes de inmunoterapia que se usan actualmente. La naturaleza curativa de esta inmunoterapia en el caso de las neoplasias sanguíneas ha conducido a explorar el uso del trasplante alogénico de células troncales como tratamiento de tumores sólidos refractarios o reincidentes.⁹²

Actualmente existe evidencia confirmando la existencia del efecto Graft *versus* tumor (GvT) en neoplasias no hematológicas.⁹²

Eibl y col., reportaron el caso de una mujer que presentaba cáncer de seno la cual fue tratada con quimioterapia ablativa de la médula y un trasplante alogénico con células troncales de un hermano HLA idéntico, el efecto GvT fue deducido al presentarse la involución de una extensa área de metástasis en el hígado, que ocurrió al mismo tiempo que se presentó la enfermedad GvH en su presentación aguda, aunque éste es un caso aislado y se requiere de realizar éste tipo de tratamiento con más pacientes para asegurar su eficiencia.⁹³

Se sabe que los efectos tóxicos asociados con el acondicionamiento mieloablativo son uno de los mayores problemas relacionados con la mortalidad y morbilidad causadas por el trasplante alogénico mieloablativo de células troncales. Esto ha llevado a los investigadores a diseñar regímenes de

acondicionamiento de menor intensidad para probar la hipótesis del efecto GvT y saber si éste por sí sólo es suficiente para inducir la remisión (cura) total en las neoplasias sanguíneas. Para facilitar el implante de las células del donador estos regímenes de baja intensidad usan potentes agentes inmunosupresores que presentan considerablemente menos toxicidad que sus predecesores mieloablativos.⁹²

Los resultados de algunos ensayos clínicos han confirmado que los efectos GvT generados con el método no mieloablativo pueden ser curativos para una variedad de neoplasias sanguíneas. El perfil de seguridad mejorado y los éxitos preliminares en pacientes con neoplasias sanguíneas ha despertado el interés de investigar si esta variante de trasplante con células troncales puede ser utilizada también en neoplasias sólidas, por lo que se han realizado algunos experimentos en pacientes, que padecían tumores metastásicos refractarios a la típica quimioterapia citotóxica, aún en dosis altas.⁹²

Al realizar el trasplante de células troncales hematopoyéticas utilizando un régimen de acondicionamiento de baja dosis o baja intensidad, se obtiene una inmunosupresión suficiente para asegurar tanto el implante de las células del donador como el efecto GvT, este régimen de baja intensidad o no mieloablativo evitará la toxicidad asociada a un acondicionamiento de altas dosis.

Existen varios acercamientos de este método no ablativo que actualmente están siendo investigados y probados en pacientes con carcinoma renal metastásico, al parecer este procedimiento ha sido tolerado bien, aunque la incidencia de complicaciones relacionadas con el trasplante, incluyendo rechazo del

transplante, GvHD y mortalidad relacionada con el transplante varía.⁹²

Childs y col., reportaron que el transplante no ablativo de células troncales puede inducir la regresión sostenida de carcinoma renal en pacientes que no presentaron respuesta a la terapia convencional, realizaron el estudio en 19 pacientes los cuales recibieron un acondicionamiento con ciclofosfamida y fludarabina, seguida de una infusión con células troncales hematopoyéticas obtenidas de sangre de un hermano o hermana HLA idéntico, se usó ciclosporina para prevenir la GvHD, 10 de los pacientes presentaron regresión de la metástasis 3 presentaron una remisión total y 7 remisión parcial, la regresión de la metástasis fue lenta y como consecuencia de la suspensión de la administración de la ciclosporina y el establecimiento completo y quimerismo de los linfocitos T del donador.⁹²

9.2. TERAPIAS EXPERIMENTALES CON CÉLULAS TRONCALES

9.2.1. SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

En la actualidad la mayoría de los tratamientos para el cerebro o la médula espinal dañados intentan atenuar los síntomas y limitar el daño, pero recientes investigaciones que involucran los mecanismos de regeneración del sistema nervioso central, hacen mención del descubrimiento de células troncales en el cerebro adulto que pueden dar origen a nuevas neuronas y células de la glía, esto ha despertado el interés por descubrir la manera de reparar el sistema nervioso dañado.⁹⁴

La investigación de las células troncales para el tratamiento de desórdenes del sistema nervioso tales como el mal de Parkinson, es una de las áreas en las cuales existe evidencia de terapia celular basada en reemplazar ó devolver la función perdida.⁹⁴

La enfermedad de Parkinson es un desorden neurodegenerativo caracterizado por la pérdida progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra del mesencéfalo y una reducción en la dopamina estriatal. Los pacientes al inicio de la enfermedad responden al tratamiento con medicaciones dopaminérgicas como la levodopa, pero con el tiempo su efectividad va disminuyendo porque la conversión a dopamina dentro del cerebro se ve interrumpida progresivamente por la degeneración continua de las terminales dopaminérgicas, por lo que se empezaron a buscar otras terapias para restaurar el sistema dopaminérgico dañado, tales como el transplante de células o tejidos

que sintetizan catecolaminas, algunos de los ensayos clínicos que se realizaron se basaban en el uso de tejidos fetales de la sustancia negra, los pacientes presentaron un alivio sintomático pero existieron dificultades técnicas y éticas en la obtención de tejidos apropiados y suficientes para esta terapia.⁹⁵

Por lo que se pensó en utilizar las células ES, hace algunos años se establecieron líneas celulares de humanos y su habilidad para diferenciarse en diversos linajes celulares incluyendo el linaje neural, ha sido demostrada *in vivo* e *in vitro* por Schuldiner.⁹⁶

Se han realizado algunos experimentos en modelos animales de la enfermedad de Parkinson, como por ejemplo:

Jong-Hoon y col., reportaron que las células troncales embrionarias pueden generar eficientemente células precursoras del mesencéfalo y neuronas dopaminérgicas. El análisis funcional de las neuronas derivadas a partir de células troncales embrionarias fue probado por medio de exámenes anatómicos, neuroquímicos, electrofisiológicos y de conducta. Las células positivas a tirosina hidroxilasa (TH+) derivadas de células ES liberaron dopamina, la cual se extendía por los axones hasta el área del striatum en modelos animales (ratas) de la enfermedad de Parkinson, formando así conexiones sinápticas funcionales, modulando conductas inducidas espontánea y farmacológicamente. Los datos obtenidos comprobaron que las neuronas dopaminérgicas derivadas de células troncales embrionarias sobreviven y llevan a cabo su función después de realizar el trasplante en la zona del cuerpo estriado lesionada.⁹⁷

Por otra parte en experimentos hechos con neuronas dopaminérgicas

provenientes de mesencéfalo fetal al ser transplantadas en la zona intraestriatal en ratas parkinsonianas inervaron el cuerpo estriado y mejoraron la asimetría motora.⁹⁸

A pesar de que se han presentado resultados que alientan el desarrollo de estrategias que involucran el desarrollo de neuronas por medio del uso de células ES para el tratamiento de enfermedades neurológicas, se requiere de realizar más estudios, ya sea en modelos animales roedores o primates para comprobar la seguridad y eficacia de éstas células.⁹⁷

No sólo se realizan investigaciones para curar el mal de Parkinson, también algunos investigadores intentan encontrar la manera de reparar la médula espinal dañada.

La desmielinización contribuye a la pérdida de la función como consecuencia de daño en el sistema nervioso central. Mejorar la remielinización por medio de trasplante de células productoras de mielina puede ofrecer un acercamiento importante para el restablecimiento de la función neurológica.⁹⁹

Liu y col., reportaron que al inducir células ES de ratón con ácido retinoico se pueden obtener cultivos de oligodendrocitos, y éstos son capaces de mielinizar axones *in vitro*. Para probar si las células ES pueden sobrevivir, migrar y diferenciarse en células maduras productoras de mielina en áreas con desmielinización del sistema nervioso central en animales adultos, las células ES fueron transplantadas hacia el interior de las columnas dorsales de la médula espinal de ratas adultas 3 días después de que se les practicó un tratamiento químico para inducir la desmielinización, y lo que se encontró fue que en el área de desmielinización, gran cantidad de células ES sobrevivieron y se

diferenciaron principalmente en oligodendrocitos maduros que fueron capaces de mielinizar los axones.

Por otra parte cuando células de oligosfera (fase intermedia de diferenciación entre células ES y oligodendrocitos) fueron transplantadas en la médula espinal de ratones mutantes deficientes en mielina, los oligodendrocitos derivados de células ES migraron hacia los tejidos del ratón receptor, produciendo mielina y mielinizando los axones. Lo que demuestra que los oligodendrocitos derivados de células ES son capaces de mielinizar axones *in vitro* y de reemplazar la mielina perdida en el sistema nervioso central de adultos, estos estudios representan un acercamiento en el tratamiento de las enfermedades desmielinizantes por causa primaria o secundaria del sistema nervioso central adulto.¹⁰⁰

Se han realizado una gran cantidad de experimentos en modelos murinos con la finalidad de descubrir la manera de encontrar terapias eficientes para restaurar la función después de un daño en el sistema nervioso central.

Saporta y col., sugieren que las células troncales de cordón umbilical contenidas en la sangre de cordón umbilical al ser inyectadas (previamente marcadas) vía intravenosa pueden ser benéficas al contrarrestar los efectos ocasionados por el daño en la médula espinal, ya que se observó que las células migran al sitio de lesión y participan en el proceso de recuperación de las lesiones causadas por algún tipo de trauma.¹⁰¹

Embolia

Hoehn y col., realizaron la observación de la migración celular *in vivo* permitiendo el monitoreo de la dinámica celular dentro de individuos animales, en periodos prolongados, utilizaron células ES que expresaban la proteína verde fluorescente (GFP), las cuales fueron marcadas a su vez por un proceso de lipofección con un medio de contraste utilizado en la resonancia magnética para después ser implantadas en el cerebro de ratas.

Una isquemia local fue inducida 2 semanas antes de la implantación de las células ES en el hemisferio contralateral sin daño. Se realizó la resonancia magnética permitiendo la observación de las células implantadas con el contraste observado con el tejido del animal receptor, el cual fue confirmado al registrar la presencia de la GFP, durante 3 semanas las células migraron a lo largo del cuerpo calloso hasta las paredes ventriculares, y poblaron masivamente la zona dañada que se encontraba en el hemisferio opuesto a la zona de implantación. Lo cual permite concluir que las células ES migran hacia las áreas de lesión.¹⁰²

8.2.2. DIABETES

Debido a la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas productoras de insulina en pacientes con Diabetes tipo 1 y en los pacientes con diabetes tipo 2 que presentan una secreción insuficiente de insulina, los diabéticos dependen de la sustitución de insulina exógena a lo largo de su vida. Se han establecido terapias alternativas para los diabéticos, una de las cuales es el trasplante de islotes pancreáticos humanos, pero esta terapia se ve limitada por la falta de donadores disponibles. La intensa búsqueda para encontrar nuevas fuentes de células β , ha llevado a centrar las esperanzas en las células troncales de humanos, siendo que las células productoras de insulina pueden ser generadas de las células ES ó bien de las células troncales de adulto, aunque ambos tipos de células difieren en cuanto a disponibilidad, expansión *in vitro*, potencial de diferenciación y la capacidad para producir tumores.¹⁰³

Soria y col., desarrollaron un método para obtener células productoras de insulina a partir de células ES de ratón, la metodología que utilizaron para seleccionar las células que producían insulina fue la siguiente y consiste en transfectar las células ES con un gen quimérico formado por la fusión funcional del promotor de la insulina acoplado a un gen de resistencia a la neomicina. Así, aquellas células que contengan el complejo de transcripción que activa la expresión de dicho gen tendrán también activada la expresión del gen de resistencia a la neomicina, las células clonadas fueron cultivadas bajo varias condiciones, las que fueron cultivadas en bajas concentraciones de glucosa se diferenciaron y fueron capaces de responder a los cambios en la concentración

de glucosa, aumentando la secreción de insulina, las células productoras de insulina fueron implantadas en el bazo de animales diabéticos, respondiendo favorablemente al normalizar los niveles de glucemia a la semana del tratamiento. El método descrito previamente ha permitido la obtención de una línea celular que no sólo contiene insulina, sino que posee secreción regulada de la misma.¹⁰⁴

McKay y col., han descrito una serie de experimentos en los cuales inducen a las células ES de ratón a diferenciarse en estructuras productoras de insulina similares a los islotes pancreáticos.¹⁰⁵

Cultivaron las células ES y las dejaron crecer hasta formar cuerpos embrioides, después seleccionaron una población celular dentro del cuerpo embrioide que expresa un marcador de las células neurales, la nestina y utilizando una técnica de cultivo, se obtuvieron células que formaban la estructura del islote pancreático, y eran capaces de responder a concentraciones normales de glucosa, secretando insulina aunque la cantidad de insulina fue menor a la normalmente secretada por los islotes.¹⁰⁵

8.2.3. INFARTO AL MIOCARDIO

La oclusión de los vasos coronarios seguida de la isquemia al miocardio rápidamente resulta en la necrosis coagulativa del miocardio, tras la formación de una cicatriz, cuando la circulación sanguínea regresa al miocardio, existe una rápida aparición de una banda de contracción necrótica y una intensa inflamación, las células inflamatorias, son críticas para la eficiente reparación de la pared ventricular, mediando un proceso que consiste en la resorción del material necrótico, formación de una cicatriz y angiogénesis. Esta eficiente reparación permite la función ventricular a pesar de la pérdida de algunos miocitos, es bien conocido que los miocitos no tienen la capacidad de dividirse, por lo que los miocitos dañados no son remplazados normalmente y en su lugar se forma una cicatriz. A raíz de los estudios hechos con células troncales se ha sugerido que las células troncales podrían ser utilizadas para regenerar las células del miocardio.¹⁰⁶

Jackson y col., transplantaron células troncales hematopoyéticas conocidas como población lateral (SP ó side population) en ratones letalmente irradiados e inducidos a isquemia del miocardio ocluyendo la arteria coronaria por 60 minutos seguido de la reconstitución del flujo sanguíneo. Las células transplantadas (CD34⁻/low, c-Kit⁺, Sca-1⁺) o su progenie migraron al músculo cardíaco isquémico y a los vasos sanguíneos, para diferenciarse en cardiomiocitos y células endoteliales.¹⁰⁶

Las células SP fueron purificadas de un ratón transgénico que expresa el gen lacZ. Los cardiomiocitos derivados de los ratones donadores fueron

encontrados principalmente en la región que rodeaba al infarto, y expresaban el gen lacZ y actinina, las células endoteliales derivadas de las SP expresaron lacZ y Flt-1 que es un marcador propio de células endoteliales, las células marcadas se encontraron principalmente en vasos pequeños adyacentes a la zona de infarto.¹⁰⁶

Por otra parte Orlic y col., investigaron el potencial de las células troncales de médula ósea para diferenciarse en cardiomiocitos, dentro de un miocardio dañado por isquemia. Los infartos fueron producidos por ligación de la arteria coronaria izquierda. La zona de infarto fue tratada con células troncales Lin- y c-kit aisladas de médula ósea obtenida de ratones machos transgénicos que expresan la proteína verde fluorescente (eGFP), se administraron dos inyecciones dentro del miocardio sano adyacente a la zona de infarto, 5 horas después de la oclusión realizada sobre la arteria coronaria. Nueve días después del trasplante los corazones mostraron una banda de miocitos positivos a la GFP y al cromosoma Y, dentro del miocardio dañado. Los miocitos positivos a la GFP también fueron positivos a miosina cardíaca y a la actina sarcomérica.¹⁰⁷

En otro experimento investigaron la habilidad de las células troncales de médula ósea que habían sido movilizadas por medio de inyecciones a base del factor de células troncales ó SCF y el factor estimulante de las colonias de granulocitos G-CSF, para migrar hacia el área de infarto y promover la reparación del mismo.¹⁰⁸

A los 27 días después del tratamiento con las citocinas mencionadas y de la inducción de infarto por la oclusión de la arteria coronaria izquierda, las células movilizadas de la médula ósea habían regenerado el miocardio en la zona de

infarto, contribuyendo también a la regeneración de arteriolas, por medio de células endoteliales y de músculo liso.¹⁰⁸

La reparación del miocardio infartado por medio de la movilización a base de citocinas resultó en el mejoramiento de la función cardíaca y mayor sobrevivencia. La eyección del ventrículo izquierdo fue mayor en los ratones tratados con las citocinas que en grupo control.¹⁰⁸

9. REPROGRAMACIÓN DIRECTA DE CÉLULAS SOMÁTICAS

Las metodologías que actualmente se describen para reprogramar células son:

1. **Reprogramación de las células somáticas por medio de transferencia nuclear**
2. **Reprogramación de células somáticas por medio de hibridación celular**
3. **Regulación de la modificación epigenética**

1. **Reprogramación de las células somáticas por medio de transferencia nuclear**, la transferencia nuclear de las células somáticas dentro de un ovocito no fertilizado es una de las posibilidades para acercarse a la producción de células totipotenciales, a esto se le conoce como embriones clonados. La producción de animales clonados tuvo lugar hace más de 30 años y se realizó por primera vez en anfibios, las ranas clonadas fueron producidas por transferencia nuclear de las células del endodermo intestinal de renacuajos a ovocitos anucleados (Gurdon, 1962). Lo importante de este proceso fue la exitosa reprogramación de la célula somática llevada a cabo por el citoplasma del ovocito, más recientemente la capacidad de reprogramación celular ha sido demostrada en mamíferos con la clonación de ovejas, vacas, ratones y cerdos.^{72, 109-112}

Dentro del área biomédica esta técnica ofrece ventajas invaluable, ya que ofrece la oportunidad de producir células ES derivadas del blastocisto clonado por células somáticas, el genotipo de estas células sería idéntico al de la célula

somática por lo tanto el sistema inmune del donador será completamente tolerante a las células ES obtenidas del blastocisto clonado, de esta manera se podría llevar a cabo lo que se conoce como clonación terapéutica.^{113,114}

Las células somáticas altamente diferenciadas normalmente son incapaces de transformarse en células troncales pluripotenciales por inducción extrínseca. Sin embargo la producción exitosa de animales clonados a partir de células totalmente diferenciadas, demuestra que los ovocitos no fertilizados de mamíferos contiene factores muy importantes que son capaces de reprogramar los núcleos de células totalmente diferenciadas en células troncales totipotenciales ó pluripotenciales.¹¹⁴

2. Reprogramación de células somáticas por medio de fusión celular, similar a la producción de animales clonados por medio de transferencia nuclear, el estado epigenético del núcleo de una célula somática puede ser reprogramado hereditariamente por una célula troncal pluripotencial por fusión de dos tipos celulares.¹¹³

Tada y col., describen la producción de células híbridas por fusión de las células gonadales primordiales, derivadas de células troncales germinales y linfocitos T, la metilación de (imprinted genes) heredados o no heredados, y secuencias repetidas dispersas por el genoma son borradas, además la expresión genética específica de cada tejido se pierde y el núcleo de la célula somática adquiere propiedades similares a las de las células troncales pluripotenciales, que se observa por la habilidad de diferenciarse en las tres principales capas embrionarias del desarrollo embrionario.¹¹³

La hibridación de los linfocitos T con células ES también lleva a la adquisición

de la habilidad de diferenciarse en varios tejidos. Así pues, ambos tipos de células troncales pluripotenciales conservan la capacidad común de reprogramar el núcleo de células somáticas, por medio de la acción de factores transactuantes (transacting factors). Sin embargo, es de hacer notar que el patrón de metilación alelo específica asociado con varios genes heredados (imprinted) se mantiene en el núcleo de células somáticas de las células híbridas con células ES.¹¹³

Cuando las células ES son fusionadas con linfocitos T marcados con un transgén inactivo de Oct4-GFP, el cual es un marcador ideal para identificar células troncales totipotenciales y pluripotenciales, el gen Oct4 es reactivado a las 48 horas, este intervalo sugiere que existe replicación de ADN y que la división celular puede ser un requerimiento central para inducir la reactivación. Es así, que la reprogramación nuclear de las células somáticas puede ser inducida no sólo por factores presentes en el citoplasma del ovocito, sino que también por factores transactuantes (transacting factors) derivados de las células ES ó de las células troncales germinales.¹¹³

3. Regulación de la modificación epigenética, la modificación epigenética consiste en el encendido y apagado de genes codificados por el ADN cromosomal durante la diferenciación celular. El estatus epigenético de las células troncales y de las células somáticas en diferentes estados de desarrollo es modificado al de célula troncal totipotencial o pluripotencial, si es estimulado por factores intrínsecos y extrínsecos.¹¹³

Recientes descubrimientos concernientes a las modificaciones epigenéticas revelan que la metilación del ADN, la acetilación de histonas, y la remodelación

de la cromatina están íntimamente relacionadas para regular la activación y represión transcripcional gen- específica.¹¹³

La metilación del ADN asociada con la represión transcripcional es una de las modificaciones epigenéticas mejor conocidas y es heredable a través de las divisiones celulares, la metilación del ADN es crucial para la regulación apropiada de la expresión genética, alterando la accesibilidad de la maquinaria de transcripción a los genes.¹¹⁵

Importantes progresos se han realizado para entender el mecanismo de remodelación de la cromatina por medio de las interacciones de la metilación del ADN y la desacetilación de las histonas.¹¹³

En general la acetilación de las histonas a través de la acción de las acetiltransferasas de histonas se correlaciona con la activación de los genes, por el contrario la desacetilación mediada por las desacetilasas de histonas actúan apagando los genes.¹¹³

Una vez que se conozcan los factores extrínsecos e intrínsecos que gobiernan la diferenciación durante la etapa embrionaria y la desdiferenciación de las células somáticas al someterlas a clonación, se podrá desprogramar y reprogramar a voluntad las células somáticas sin tener que recurrir a la transferencia de núcleos con la consecuente destrucción de embriones.¹¹³

10. RECONSTRUCCIÓN DE TEJIDOS Y ÓRGANOS CON CÉLULAS TRONCALES

El concepto de producir órganos o tejidos para un reemplazo debido a un daño o pérdida radica en la base de diversas prácticas biotecnológicas a las cuáles se les conoce como ingeniería de tejidos ó ingeniería tisular. El uso de células troncales de adulto puede alterar significativamente la perspectiva de la ingeniería de tejidos. La restauración exitosa a largo plazo de tejidos autorrenovables como por ejemplo la piel, dependen del uso de células troncales que como ya sabemos tienen la característica de ser autorrenovables. La identificación y aislamiento de las células troncales de varios tejidos provee una estrategia adecuada para futuras terapias génicas.¹¹⁶

La ingeniería de tejidos en el sentido clásico se basa en el uso de células específicas de órganos para sembrarlas en un andamiaje *ex vivo*. Los "andamiajes" son estructuras porosas, biocompatibles y degradables, que se fabrican, ya sea, con materiales naturales como el colágeno y la fibrina, o bien, con polímeros sintéticos como son el poliglicolido, poliláctido y el coglicolido poliláctico. Pueden ser láminas esponjosas, geles ó estructuras altamente complejas con poros intrincados y canales fabricados utilizando materiales procesados con nuevas tecnologías. Todos los andamiajes utilizados en la ingeniería de tejidos están diseñados para degradarse lentamente después de ser implantados en el paciente y así ser reemplazados paulatinamente por nuevo tejido.^{116, 117}

Cada día es más amplia la lista de tejidos que pueden ser creados a través de la tecnología de la ingeniería tisular, ésto debido en gran parte a los recientes progresos en el área de la biología de las células troncales y el reconocimiento de las propiedades únicas con las que cuentan estas células. No obstante, algunos estudios experimentales prometen grandes avances en la ingeniería tisular basada en el uso de células troncales.¹¹⁶

Algunos de los tejidos que actualmente pueden ser construidos utilizando células troncales son por ejemplo las superficies epiteliales como la piel, la córnea y las membranas mucosas, también se pueden diseñar tejidos pertenecientes al sistema músculo esquelético.¹¹⁶

10.1. RECONSTRUCCIÓN DE PIEL

La restauración permanente de tejidos como la epidermis, se caracterizan por una alta y continua autorrenovación, es decir, requiere de células troncales que son autorrenovables. Las células progenitoras representadas en un cultivo de queratinocitos presentan un pequeño compartimiento de células troncales autorrenovables a largo plazo, que es necesario para la restauración completa y permanente, y bajo condiciones clonogénicas forman diferentes tipos de colonias (holoclonos, meroclones y paraclones) que varían significativamente en su capacidad de autorrenovarse y de generar epidermis diferenciada.

Los holoclonos presentan mayor capacidad reproductiva, bajo condiciones estándar, menos del 5% de las colonias formadas por células de un holoclon terminan diferenciándose.^{116, 118}

Los paraclones producen exclusivamente células con vida replicativa corta (no más de 15 generaciones de células), para después diferenciarse.¹¹⁸

Los meroclones producen una mezcla de células con diferentes potenciales de crecimiento y presentan un estado transicional entre los holoclones y los paraclones. La incidencia de diferentes tipos clonales se ve afectada por la edad, siendo así que las células provenientes de la epidermis de donantes de mayor edad dan origen a un menor número de holoclones y mayor número de paraclones.¹¹⁸

Sólo los holoclones son el producto de verdaderas células troncales, conocidas por su capacidad de autorreplicarse, lo cual no se atribuye ni a los meroclones, que es una población de células que se amplifican transitoriamente, ni para los paraclones una población de células progenitoras senescentes o diferenciadas.¹¹⁶

En teoría una población pequeña pero purificada de células troncales productoras de holoclones es lo único que se necesita para generar trasplantes ó injertos de epidermis.

La identificación de un marcador para células troncales de queratinocitos es una nueva herramienta en la producción de epidermis.¹¹⁶

10.2. RECONSTRUCCIÓN DE TEJIDOS A PARTIR DE CÉLULAS TRONCALES MESENQUIMALES.

Las células troncales mesenquimales han sido obtenidas de la médula ósea del paciente con la finalidad de expandirlas en cultivo y después inducir las a diferenciar en células que ayuden a reparar el hueso, cartílago ó tendón lesionado.¹¹⁷

1) Hueso

En casos de lesiones extensas de hueso causadas por accidentes, resección por tumores, o por enfermedades sistémicas, el implante autólogo de hueso para la reparación del daño es un tratamiento estratégico. El trasplante autólogo de hueso trabecular es uno de los medios más efectivos para reconstruir el área de lesión, en el cual las células troncales mesenquimales y su progenie diferenciada se ubican en la lesión, aunque este proceso presenta varias desventajas como la calidad y cantidad de tejido que se puede obtener y el dolor durante la recuperación. Por lo que se ha optado por nuevas estrategias como la ingeniería tisular.¹¹⁶

Las células troncales mesenquimales se utilizan en la ingeniería de tejidos aplicada a la construcción de huesos, en la que se realizan dos estrategias diferentes:

- a. Se utilizan las células troncales mesenquimales como "fábricas celulares que liberarán proteínas" por medio de la inserción de genes (células transgénicas), las cuales se implantarán en los sitios de lesión.¹¹⁹

b. O bien, se utilizan las células troncales mesenquimales como células multipotenciales, y se permite su "diferenciación osteogénica" *in vitro* suplementando el medio de cultivo, con ácido ascórbico, dexametasona y glicerofosfato.¹¹⁹

Durante la diferenciación osteogénica la morfología de las células troncales mesenquimales cambia de una forma elongada a una forma cuboide. Se forman agregados estructurales y las células expresan marcadores moleculares específicos para la formación de hueso, como por ejemplo el factor de transcripción *cbfa-1* y se induce la producción de las proteínas de la matriz extracelular como la osteonectina, osteocalcina y la colágena de tipo I. Las células troncales mesenquimales obtenidas para cultivo deben combinarse apropiadamente con transportadores antes de su trasplante, esto permite proveer a las células un andamiaje tridimensional en el cual pueda establecerse una red vascular en la que las células troncales mesenquimales o progenitoras puedan diferenciarse hasta formar hueso. Varios materiales han sido generados y perfeccionados incluyendo la hidroxiapatita fosfato tricálcico, ácido poliglicólico y ácidos polilácticos. La mayoría son efectivos para ayudar a la regeneración del hueso, ya sean solos o en conjunto con factores de crecimiento.¹¹⁹

Las células troncales mesenquimales parecen ser poderosas candidatas para aplicarse en la ingeniería tisular de hueso. Con la edad avanzada se ha encontrado que el promedio de producción de las células troncales mesenquimales de médula ósea y las células progenitoras decrece, por lo que esto da como resultado una disminución en la capacidad de asegurar la

autorregeneración en el caso de daños o enfermedades del sistema músculo-esquelético, así pues, la ingeniería tisular puede resolver este problema por medio del aislamiento y expansión *in vitro* de las células troncales mesenquimales, sin que pierdan su habilidad de diferenciarse en osteoblastos sin considerar la edad del paciente, una vez realizada la expansión *in vitro* las células son colocadas sobre un andamiaje apropiado y colocadas en el área de lesión, esto resulta en la reparación efectiva en lugares donde la superficie de lesión es amplia y sería imposible que fuera reparada únicamente por las células residentes.¹¹⁹

2) Cartílago

En estudios recientes, el trasplante autólogo de células troncales mesenquimales fue utilizado para reparar lesiones del cartílago de la rodilla en humanos que sufrían osteoartritis, se cultivaron las células troncales mesenquimales de cada paciente se cultivaron, se embebieron en un gel de colágena y se transplantaron en el área donde se encontraba la lesión del cartílago articular, (cóndilo medial del fémur) y se recubrieron con periosteo autólogo, a diferentes tiempos después del trasplante se obtuvieron biopsias de del tejido reparado por medio de artroscopia y se analizaron histológicamente. Aproximadamente 6 semanas después del trasplante, las áreas de lesión o daño fueron cubiertas con un tejido de coloración de blanco a rosa, a las 42 semanas las lesiones fueron cubiertas por tejido blando y parcialmente con cartílago de tipo hialino. A pesar, de que el trasplante de células troncales mesenquimales resultó en un mejor desarrollo del tejido, los beneficios clínicos no fueron significativos.¹²⁰

En un futuro la regeneración del cartílago podría llevarse a cabo por medio de terapias celulares o terapias génicas, ya que al ser implantadas las células troncales mesenquimales dentro de las áreas de lesión, éstas se diferencian en condrocitos, esto es importante para áreas de lesión amplias. Hasta la fecha no se ha logrado la restauración completa del cartílago y se requiere de la integración de cartílago nuevo dentro del tejido adyacente del hospedero y se requiere también de la completa diferenciación hacia condrocitos maduros. Esto podría lograrse usando una combinación de terapia celular y/o génica basada en células troncales mesenquimales, con el uso de un grupo seleccionado de citocinas que participan en la diferenciación, como TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 (transforming growth factor) y otros factores como los BMP-2, BMP-6, BMP-7 (bone morphogenetic protein) pueden mejorar la formación de tejido.¹¹⁹

3) Tendón

Algunos estudios realizados dentro de la ingeniería tisular han mostrado que suspendiendo células troncales mesenquimales sobre gel de colágena y envolviéndolas alrededor de una sutura (por ejemplo: ácido poliglicólico) se produce el alineamiento de las mismas; la contracción de las estructuras en el medio de cultivo, permite obtener una forma apropiada que servirá para implantarlas en el tendón lesionado.¹²¹

Los análisis bioquímicos e histológicos después de utilizar esta técnica revelaron un mejoramiento en las propiedades biomecánicas, arquitectura del tejido y funcionamiento del tendón. Aunque encontrar la forma de lograr la

recuperación completa de la lesiones en los tendones necesita mayor investigación para mejorar la calidad de la reconstrucción.¹²²

11. CÉLULAS TRONCALES Y SU RELACIÓN CON CÁNCER

Debido a que las células troncales normales y las células neoplásicas comparten la habilidad de autorrenovación, se podría pensar que las células neoplásicas se apropian de la maquinaria de división celular propia de las células troncales la cual permite su autorrenovación. Algunos resultados muestran que las vías de señalización clásicas relacionados con las células cancerígenas pueden también regular el desarrollo de las células troncales normales. Por ejemplo, la prevención de la apoptosis por la sobreexpresión del oncogén *bcl-2* resulta en un incremento en el número de células troncales hematopoyéticas *in vivo* sugiriendo que la muerte celular juega un papel importante en la homeostasis de las células troncales hematopoyéticas. Otras vías de señalización asociadas con la oncogénesis, tales como Notch, Sonic hedgehog (Hh) y Wnt, regulan la autorrenovación de las células troncales.¹²³ En general las proteínas de la familia Wnt interfieren en el desarrollo de varios organismos pero se ha descubierto que pueden contribuir a la oncogénesis cuando se altera su regulación.¹²³

La activación aberrante de las proteínas de la familia de Wnt y la β -catenina se ha asociado con un gran número de neoplasias y frecuentemente se correlaciona con la sobreexpresión ó amplificación del oncogén *c-myc*, paradójicamente con el potencial de transformación celular que posee el oncogen *c-myc*, se encuentra la habilidad que presenta de también inducir a la apoptosis. Se encontró que el complejo de señalización formado por Wnt y la β -catenina suprimen la apoptosis al inhibir la liberación inducida por el *c-Myc* del

citocromo C y la activación de las caspasas. En algunos estudios realizados *in vitro* se encontró que Wnt y c-myc se coordinan para inducir la transformación celular.¹²⁴

Es probable que la vía de señalización mediada por Shh-Gli sea importante en la iniciación y/o mantenimiento de los tumores esporádicos que se derivan de tejidos y grupos celulares que usan esta vía de señalización para proliferación celular durante su desarrollo normal. Por ejemplo, los genes de Shh y Gli se expresan en los pulmones, esto se ha comparado en ratones con mutaciones en Gli 2/3, los cuáles presentan defectos en el desarrollo pulmonar, y es probable que esta vía permanezca activa en el individuo adulto, como hasta poco después del nacimiento. Así como en los pulmones, la vía de señalización de Shh-Gli está activa durante el desarrollo de la próstata y consecuentemente los carcinomas de próstata la expresan, lo que es indicativo de la presencia de su actividad.⁵⁵

No se puede asegurar si las vías de señalización que normalmente regulan la autorrenovación de las células troncales pueden conducir a la carcinogénesis cuando se altera su regulación, de ser así las células troncales serían el blanco de transformación en ciertos tipos de cáncer.¹²³

Existen dos razones para pensar que éste puede ser el caso:

- 1.** Las células troncales tienen la maquinaria para la autorrenovación activada, mantener esta autorrenovación es más simple que encenderla de nuevo en una célula que presenta mayor grado de diferenciación, se requieren menos mutaciones para mantener la autorrenovación que para activarla ectópicamente.¹²³

2. Por medio de la autorrenovación las células troncales frecuentemente persisten por largos periodos, en lugar de morir después de periodos cortos como muchas células diferenciadas en tejidos altamente proliferativos. Esto significa que hay una mayor oportunidad de que se acumulen mutaciones en células troncales individuales que en la mayoría de las células diferenciadas.¹²³

La mayoría de las células no pueden proliferar al menos que presenten mutaciones que prevengan la apoptosis o la diferenciación. Pero en el caso de las células troncales ó células precursoras con programas de largos periodos de proliferación, un sólo cambio puede permitir el mantenimiento de la hiperproliferación y por consiguiente la iniciación del tumor.⁵⁵

Para la mayoría de las neoplasias, la célula blanco que sufre las mutaciones transformantes es desconocida, sin embargo, existe evidencia de que ciertos tipos de leucemias aparecen por mutaciones que se acumulan en las células troncales hematopoyéticas, como es el caso de la leucemia mieloide aguda, en la que la anormalidad cromosómica más frecuente está relacionada con una translocación.¹²³

11.1. CÉLULAS TRONCALES DEL CÁNCER Y ORGANOGÉNESIS ABERRANTE

La investigación básica del cáncer se ha enfocado en identificar los cambios genéticos que preceden al cáncer. Esto ha permitido incrementar el entendimiento de las vías de señalización moleculares y bioquímicas que están involucradas en la oncogénesis y la transformación maligna, pero durante este proceso el entendimiento de la biología celular se ha quedado rezagado.¹²³

Un tumor canceroso puede definirse como un crecimiento aberrante iniciado por una célula neoplásica que adquiere la capacidad de proliferar indefinidamente, a causa de mutaciones acumuladas. Algunos autores mencionan que un tumor canceroso es la formación anormal de un órgano, por lo que se considera que los principios básicos de la biología de las células troncales podrían ser aplicados para entender mejor como se desarrollan los tumores neoplásicos. De hecho, varias observaciones han sugerido que existen analogías entre las células troncales normales y las células neoplásicas, ya que ambas tienen un extenso potencial de proliferación y presentan la habilidad de dar origen a nuevos tejidos, normales o anormales, y éstos están compuestos de combinaciones celulares heterogéneas, con diferentes características fenotípicas y diferentes potenciales proliferativos. Debido a que la mayoría de las neoplasias tienen un origen clonal, las células neoplásicas deben dar origen a progenies con diversos fenotipos incluyendo células neoplásicas con potencial proliferativo indefinido, así como, células neoplásicas con potencial proliferativo limitado ó sin potencial proliferativo presentando diferentes

grados de diferenciación celular, como sucede en el caso de las células troncales normales.¹²³

12. USOS DE LAS CÉLULAS TRONCALES EN LA MEDICINA VETERINARIA

12.1. ANIMALES TRANSGÉNICOS

El término de animal transgénico se aplica al animal en el cual se ha realizado una modificación genética deliberadamente, por medio de la transferencia y adición de ADN exógeno en su genoma, involucrando cada célula del organismo, incluyendo las células germinales.¹²⁵

La creación de animales transgénicos se ha vuelto una técnica fundamental para el estudio de la fisiología celular dentro de un animal, permitiendo la investigación de las funciones de las proteínas, la especificidad tisular de la regulación genética, la inserción de mutagénesis y el desarrollo de modelos animales de enfermedades para probar fármacos y tratamientos con células troncales.¹²⁶

Actualmente, el ratón es el modelo animal más accesible para la aplicación de los métodos transgénicos, debido a que es más sencilla la manipulación del genoma de esta especie, cuentan con un periodo corto de crianza, los costos de mantenimiento son bajos comparado con animales más grandes, y a que existe mayor conocimiento de la genética de los ratones. Además el ratón ha sido seleccionado recientemente como un organismo modelo en el cuál cada gen será secuenciado. Aunque el pequeño tamaño de estos animales ha provocado retos en el diseño y aplicación de la instrumentación para las medidas fisiológicas, esta desventaja normalmente se balancea con todos los beneficios

que ofrece esta especie para la realización de experimentos en animales transgénicos.¹²⁷

Hoy en día es posible introducir transgenes en ratas o en animales de talla grande, los modelos experimentales de organismos más grandes que los ratones ofrecen la ventaja de que la apreciación fisiológica es más sencilla, así como, también es más fácil observar el fenotipo adquirido después de la manipulación genética.¹²⁷

Existen dos técnicas básicas para manipular el genoma.

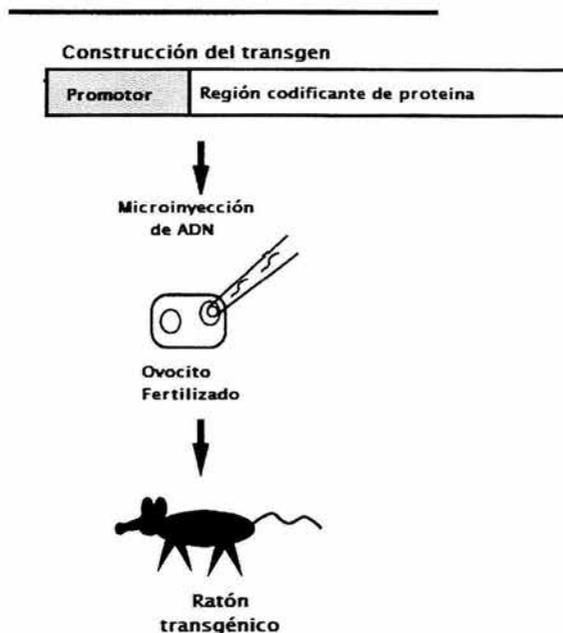
1. Integración cromosomal al azar.
2. Recombinación homóloga de ADN exógeno

1. La integración cromosomal al azar.

Se basa en la integración de ADN en localizaciones no específicas de los cromosomas, este método se lleva a cabo a través de la microinyección de ADN exógeno en el pronúcleo de embriones de una célula (ovocitos fertilizados=cigoto). Los ovocitos fertilizados o cigotos una vez que fueron microinyectados se implantan en hembras pseudogestantes y la descendencia resultante se monitorea por ejemplo con PCR (reacción en cadena de la polimerasa) para identificar a aquellos animales en los cuales el transgén (fragmento de ADN que se va a transferir) ha sido establemente insertado dentro de un cromosoma hospedero (Figura 6).¹²⁷

Figura 6. Integración al azar de ADN exógeno¹²⁷

**INTEGRACIÓN AL AZAR DE ADN EXÓGENO A
LOS CROMOSOMAS DEL HOSPEDERO**



Procedimiento para integrar ADN exógeno al genoma de manera aleatoria.

Esta técnica se ha aplicado también en animales de producción aunque la proporción de animales sobrevivientes resultado de esta técnica es menor que en el caso de los ratones. Este método presenta desventajas importantes en todas las especies, ya que no se puede predecir los efectos que causará el sitio de incorporación del transgén y el número de copias del transgén en la expresión genética conduce a la necesidad de probar múltiples líneas para asegurar la expresión apropiada del transgén, por otra parte esta técnica está restringida a la adición de material genético.¹²⁸

Estas desventajas han sido parcialmente superadas en los ratones por medio del desarrollo de una ruta alternativa de la transgénesis a través del uso de células troncales embrionarias de ratón, estas células pueden ser genéticamente modificadas *in vitro* para después inyectarlas dentro de embriones, donde continuarán con su desarrollo normal, formándose animales quiméricos, que contarán con el nuevo genotipo, el cual será transmitido a su descendencia.¹²⁸

La integración al azar de un transgén se utiliza comúnmente para los siguientes propósitos:

- a. Con la finalidad de forzar la expresión de una proteína recombinante, para alterar la fisiología y/o morfología de un animal.
- b. Para el análisis de los mecanismos transcripcionales de control involucrados en vías de señalización regulatorias.

En la mayoría de las aplicaciones de esta técnica, no se intenta modificar los genes endógenos. Para expresar una proteína recombinante en un animal, el ADN exógeno o transgén que se va a inyectar consiste en al menos dos módulos, una región transcripcional regulatoria seleccionada para dirigir la expresión del gen exógeno en una célula ó tejido específico y la región que codifica la proteína exógena para su expresión.¹²⁷

Para alterar el fenotipo de un animal: el transgén puede codificar una proteína nativa, así que el experimento muestra las consecuencias de la producción anormal de la proteína en una célula que normalmente la expresa (sobreexpresión). En otros experimentos, el diseño es expresar una proteína en un tipo celular que normalmente no la produce (producción ectópica).¹²⁷

Otra aplicación común de la técnica de integración cromosomal al azar de los transgenes es para identificar elementos que controlan la transcripción, tales como los promotores, reforzadores y regiones controladoras de locus, que responden a señales de desarrollo o estímulos fisiológicos. En esta aplicación la región codificante también conocida como gen reportero, está ligado al segmento de ADN que se cree contiene los elementos reguladores de interés (sitios de unión para factores de transcripción). Los genes reporteros, codifican proteínas inocuas biológicamente que son fáciles de detectar por análisis histológicos o bioquímicos convencionales.¹²⁷

2. La recombinación homóloga de ADN exógeno, esta tecnología se basa en el uso de las células troncales embrionarias, consiste en la habilidad que presenta la maquinaria celular para unir dos fragmentos de ADN que comparten tramos de secuencias muy similares ó idénticos, este mecanismo por medio del cual se desarrolla la recombinación homóloga en los mamíferos aún no ha sido esclarecido.¹²⁹

La eliminación o sustitución de genes en células ES por medio de la recombinación homóloga, consiste en un intercambio entre el gen a modificar y el ADN exógeno. Estas manipulaciones pueden ser usadas para:¹²⁹

- a. Inactivar la expresión de un gen.¹²⁹
- b. Modificar su esquema de expresión.¹²⁹
- c. Alterar su producto.¹²⁹
- d. Para reestablecer la actividad de un loci mutante no funcional dentro del genoma.¹²⁹

Por este método es posible reemplazar una proteína propia de un animal, por ejemplo la albúmina sérica por su contraparte humana o eliminar los genes que codifican para las enzimas responsables de las reacciones alérgicas que la leche bovina produce en algunos seres humanos. La recombinación homóloga de ADN exógeno, se distingue de la integración cromosómica al azar, en que permite crear cambios muy precisos dentro del genoma.¹²⁷

La aplicación más interesante de la recombinación homóloga de ADN exógeno es la creación de los animales knock-out y knock-in. La recombinación homóloga también se ha utilizado para producir los llamados anticuerpos humanizados a partir de ratones, estos anticuerpos podrían servir en nuevas terapias contra el cáncer.¹²⁹

12.2. ANIMALES KNOCK-OUT

La más interesante y compleja aplicación de la recombinación homóloga de un transgén es utilizada para producir la deficiencia de una proteína en específico, por medio de la interrupción de regiones transcribibles (exones) de un gen endógeno específico. A esta aplicación se le conoce como "gen knock-out". El genoma de los mamíferos cuenta con dos copias de cada cromosoma excepto por los cromosomas X y Y en los machos, pero sólo una copia del gen de interés (el alelo blanco) es interrumpido inicialmente.¹²⁷

Para crear un animal knock-out, se debe construir un rastreador de genes ó vector, que está formado básicamente por tres partes:

- 1) Un plásmido
- 2) marcadores de selección
- 3) Secuencia de ADN que se va a introducir (construcción de ADN)

El plásmido provee la estructura para llevar a cabo la manipulación del ADN dentro de las células, cuenta con un marcador de selección, el cual se flanquea en las terminaciones 5' y 3' con secuencias que son idénticas y colineares con las secuencias endógenas del "gen blanco". El gen de resistencia a la neomicina (*neo*) es comúnmente utilizado como marcador de selección, éste permite el monitoreo del ADN que se ha introducido a las células, por medio de electroporación que es un método que permite hacer las membranas celulares temporalmente más permeables, para "seleccionar" las células transfectadas con las secuencias de ADN exógeno (construcción de ADN), se puede utilizar

geneticina la cual mata a las células que no han integrado la construcción de ADN que contiene el gen *neo*, o bien se pueden identificar las recombinaciones homólogas con las técnicas del PCR y Southern blotting.^{129, 130}

Las secuencias de ADN de la construcción, que son idénticas a aquellas del gen blanco se les conoce como dominios homólogos y participarán en el proceso de recombinación.¹²⁹

Básicamente existen dos tipos de vectores para formar alelos knockout, estos vectores proveen una sola herramienta para modificar el gen de interés *in vitro*.¹²⁹

El primer tipo de vector se diseña de tal manera que después de la linearización con enzimas de restricción para introducir el ADN dentro de las células, éste permanezca colinear con las secuencias endógenas del alelo de interés. Cuando ocurre la recombinación homóloga el vector reemplaza las secuencias endógenas, por lo que a este vector se le conoce como **vector de reemplazo**. Las secuencias que yacen fuera de los dominios homólogos son excluidos de la integración durante el proceso de recombinación homóloga. El segundo tipo de vector se lineariza de tal forma que al emparejarse el vector con las secuencias endógenas se produce la inserción del ADN exógeno, esto da como resultado la duplicación parcial del alelo blanco, a este vector se le conoce como **vector de inserción**.¹²⁹

Existe un grupo de "recombinasas específicas de sitio" que son enzimas que catalizan la recombinación entre dos secuencias de ADN, si estos sitios son diseñados apropiadamente en el vector, la recombinación sitio específica puede provocar la expresión adecuada del transgén ó ADN exógeno insertado. Las

enzima más utilizada es la Cre, que proviene del bacteriófago P1, y recombina el ADN entre dos sitios de reconocimiento para loxP de longitudes de 34 bp.¹²⁹

Las células que fueron transfectadas con el ADN exógeno se introducen en blastocistos, éstos se transfieren en hembras pseudogestantes, para completar su desarrollo embrionario, lo cual resulta en la formación de animales quiméricos, algunos presentan tejidos derivados del blastocisto original (genotipo wild type) y otros tendrán tejidos derivados de las células ES manipuladas (genotipo alterado).¹²⁷

Los animales quiméricos que se obtuvieron se cruzan entre ellos por varias generaciones hasta obtener animales homocigóticos knock-out.

Esto permite el análisis de animales heterocigóticos portando un sólo alelo (alelo nulo), el cual, puede o no, producir un fenotipo anormal. Haploinsuficiencia es un término que se usa cuando se presentan anomalías y éstas resultan de la mutación de sólo una de las dos copias de un gen cualquiera. Si los animales heterocigóticos "nulos" son viables y fértiles, el apareamiento de dos animales "nulos" heterocigóticos generará crías en las cuales un promedio del 25% tiene dos copias del alelo modificado (homocigótico nulo $-/-$) y por lo tanto son completamente deficientes en la proteína codificada por este gen, la mitad de las crías serán animales heterocigóticos nulos ($+/-$) como los padres, y el 25% restante será normal ($+/+$ ó tipo silvestre "wild type"). Los porcentajes de los genotipos representados en la descendencia de tal apareamiento pueden variar, por ejemplo si el gen problema es esencial para el funcionamiento embrionario y la vida fetal.¹²⁷

12.3. ANIMALES KNOCK-IN

Otra importante variación del uso de la recombinación homóloga para producir animales transgénicos, es el acercamiento relacionado con la introducción de un nuevo gen en el mismo locus, a esto se le conoce como knock-in. Esta estrategia puede ser utilizada para insertar un gen reportero, por ejemplo: una proteína verde fluorescente ó el gen β -galactosidasa de *Escherichia coli* (LacZ), la expresión del mismo depende de los mismos controles regulatorios que fueron colocados en el gen que fue reemplazado. Esto es muy útil para poder marcar un tipo celular en particular o para facilitar los estudios de la regulación del gen. Alternativamente al reemplazamiento del gen puede usarse para determinar el grado de la redundancia funcional entre las dos proteínas ó para examinar el fenotipo producido por reemplazar una proteína normal con una forma mutante.¹²⁷

12.4. APLICACIONES DE LOS ANIMALES TRANSGÉNICOS DENTRO DE LA BIOMEDICINA Y LA AGRICULTURA.

Algunas aplicaciones potenciales dentro del área de los animales de producción involucrarían la intervención en complejas rutas metabólicas, donde el objetivo principal sería lograr un cambio fenotípico predeterminado, lo cual representa un reto adicional, por que sería necesario predecir exactamente las consecuencias fenotípicas de una sencilla modificación genética.¹²⁸

12.4.1. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS

Las aplicaciones más directas de la transgénesis en los animales de producción son aquellas en las que los objetivos sean simplemente obtener mayores cantidades de proteínas recombinantes. No es sorprendente, por lo tanto que las aplicaciones transgénicas más exitosas a la fecha estén relacionadas con la expresión de proteínas terapéuticas humanas en la leche de vacas, cabras y borregos transgénicas.¹²⁸

Existe la producción comercial de fármacos obtenidos a partir de fluidos corporales de animales transgénicos, se ha centrado la atención en la glándula mamaria, aunque otros fluidos corporales presentan beneficios particulares para ciertas aplicaciones. Por ejemplo, la hormona de crecimiento humana ha sido expresada por el epitelio de la vejiga de ratones bajo el control del promotor murino denominado uroplakin. Las ventajas de la producción a partir de la vejiga podrían incluir la habilidad de obtener el producto de todo tipo de animales y en cualquier etapa de sus vidas y es muy pequeña la cantidad de

proteína de las cuales la proteína recombinante necesitaría ser purificada.¹³¹

Se han creado cerdos transgénicos que expresan hemoglobina humana en su sangre, como un sustituto libre de células para el plasma humano, aunque este método ha sido obstaculizado por la dificultad de separar la hemoglobina humana de la porcina.¹²⁸

Por mucho la fuente más factible de la cual se pueden obtener proteínas recombinantes es la leche. La leche es un fluido menos complejo que la sangre, esto realza las perspectivas para la rápida purificación de proteínas recombinantes, además las proteínas de la leche están presentes en el sistema circulatorio a niveles muy bajos ó casi imperceptibles, así se minimizan los problemas que se podrían ocasionar en la salud del animal como consecuencia de altos niveles circulantes de proteínas activas metabólicamente.¹²⁸

A diferencia de los productos derivados de la fermentación, las proteínas recombinantes producidas en la glándula mamaria son modificadas posteriormente de una manera que casi mimetiza su modificación en humanos, son mas semejantes y estables, tienen una alta actividad biológica y no son inmunogénicas en los pacientes.¹²⁸

La producción de proteínas farmacéuticas en la glándula mamaria de animales transgénicos principalmente en ovejas, cerdas y ratones, se está comercializando rápidamente por ejemplo, se ha logrado generar α -1 antitripsina que es una proteína del plasma que inhibe a la elastasa, enzima clave de la respuesta inflamatoria, que puede conducir a la destrucción masiva de los tejidos, por lo tanto la α -1 antitripsina es una buena opción para el tratamiento del enfisema, la fibrosis quística y otras condiciones en las cuales el

tejido conectivo es afectado irreversiblemente. McCreath y col., realizaron una estrategia de flanqueo de genes para insertar el transgén que codifica para la α -1 antitripsina, permitiendo así la alta expresión de la proteína en la leche de una oveja transgénica.¹³²

Los factores de coagulación como la antitrombina III, el factor VIII y IX, el fibrinógeno para el tratamiento de desórdenes de la coagulación, y la proteína C para el tratamiento de coágulos, también se menciona el potencial que tendrían los animales transgénicos para producir anticuerpos recombinantes, ya que podrían ser producidos a grandes escalas, lo cual sería de gran ayuda debido a su utilización como agentes terapéuticos.^{133, 134}

Las proteínas recombinantes antitrombina III y la α -1 antitripsin provenientes de animales transgénicos se encuentran actualmente en ensayos clínicos fase III y II respectivamente y esta primera generación de animales transgénicos han iniciado esta nueva industria, conocida en inglés como "biopharming".¹²⁸

Muy relacionado con el "biopharming" es la idea de la modificación genética de las proteínas de la leche que podrían ser utilizadas para mejorar las propiedades nutricionales e industriales de la leche, el principal objetivo nutricional es la humanización de la leche de bovino para el mercado de la fórmula infantil. Se ha desarrollado ganado bovino lechero transgénico que transporta el cADN para la lactoferrina humana, la glicoproteína más importante del suero de la leche humana, la lactoferrina también desempeña el papel de transportar el hierro y ayuda a la protección contra las bacterias.¹³⁵

Otras aplicaciones de la transgénesis para alterar las propiedades industriales de la leche incluyen la modificación del contenido de caseína por

medio de la introducción de copias adicionales de genes que codifican para las proteínas β -caseína y κ -caseína con la finalidad de alterar las propiedades de coagulación de la leche, alterando la proporción de residuos hidrofóbicos mejorando sus propiedades de emulsificación y el grado de maduración del queso.¹³⁶

Un aspecto desalentador de la transgénesis en los animales de producción es que a pesar del amplio rango de oportunidades que presenta, existen sólo unos cuantos ejemplos prácticos. Esto se ha atribuido en parte al relativamente bajo valor de los productos agrícolas en comparación con los biomédicos y en parte al conservacionismo inherente de la industria agrícola.¹²⁸ Por otra parte se debe considerar el tiempo y dinero que se requiere para generar un número suficiente de animales modificados genéticamente, por otra parte la más grande barrera que se debe superar radica en el hecho de que la producción de la leche por medios transgénicos y destinada para consumo humano, aún no es ampliamente aceptada por los consumidores y en varios países está prohibido por la ley.¹²⁸

12.4.2. MODELOS ANIMALES

En el caso de los ratones las células ES permiten recrear eficazmente, lesiones genéticas que se asocian con enfermedades genéticas en los humanos. La producción de modelos murinos con genes flanqueados se ha convertido en rutina. En los animales de producción la factibilidad de la ingeniería de animales modelo puede ser sensible al valor agregado de un modelo de animal de producción sobre su correspondiente modelo murino y para una amplia aplicación se requiere el desarrollo de la técnica de flanqueo de genes en líneas celulares de animales de producción.¹³⁷

Con los modelos animales en general, el fenotipo resultante usualmente se puede anticipar, aunque las diferencias entre especies frecuentemente confunden estas expectativas, ya que no siempre se expresan los signos de las enfermedades de la misma manera; por ejemplo: los modelos murinos de la fibrosis quística fallan al no presentar la misma patología pulmonar característica de esta enfermedad en humanos.¹³⁷

Mientras es claro que la mayoría de los modelos murinos han sido invaluable en el estudio de enfermedades humanas, es igualmente cierto que para ciertas enfermedades, los modelos murinos presentan serias limitaciones.¹³⁷

Algunos de los animales de producción comparten con el humano similitudes en la anatomía, tamaño, fisiología y tiempo de vida, lo cual frecuentemente les permite ser mejores modelos que los ratones. El cerdo ha sido particularmente útil en el pasado como modelo de la falla renal, infartos al miocardio, hipercolesterolemia y aterosclerosis.^{128, 138}

En el caso de la fibrosis quística existe la evidencia de que los ovinos representan mejor la enfermedad que los ratones. En humanos la fibrosis quística se caracteriza por infecciones pulmonares recurrentes y destrucción pancreática, los modelos murinos de la fibrosis quística que se han creado con mutaciones en el gen CFTR, teniendo como resultado defectos en el gen regulador de la conducción transmembranal de la fibrosis quística (CFTR) no reproducen la enfermedad, sólo presentan signos leves de enfermedad en las vías aéreas y su función pancreática es normal, por el contrario la mayoría de estos modelos animales mueren por obstrucción intestinal.¹³⁷

Por otra parte, la proteína ovina CFTR es 95.3% similar a la secuencia de aminoácidos en la proteína de los humanos y tiene un patrón de expresión muy similar, además el pulmón de los ovinos comparte similitudes anatómicas, funcionales y electrofisiológicas con el del humano. Al menos un grupo se ha interesado en la búsqueda de un CFTR mutante en rebaños comerciales en Nueva Zelanda.¹³⁹

La transgénesis basada en células troncales de animales de producción y la posibilidad del flanqueo genético en estas especies abre nuevas oportunidades para la ingeniería de modelos animales de talla grande. Los ovinos podrían ser un ejemplo de animales knock out para el estudio del gen CFTR, una ventaja importante de los modelos animales creados es que una ó dos de las mutaciones que comúnmente ocurren en los pacientes afectados con la fibrosis quística puede ser imitada específicamente.¹³⁹

Una de las limitaciones generales para crear animales de producción knock out es que en la mayoría de los casos sólo los animales knock out homocigóticos

son útiles, esto representa problemas al intentar diseminar los genotipos a los que se les ocasionó la pérdida de función, dentro de poblaciones comerciales.¹²⁸

12.4.3. XENOTRANSPLANTES

El xenotransplante se refiere a cualquier procedimiento relacionado con el uso de células, tejidos u órganos provenientes de animales para su transplante, implante ó perfusión en humanos.¹²⁸

Se sabe que existen muchas personas que requieren recibir el transplante de algún órgano, y también se conoce la escasez de órganos disponibles, por lo que una de las opciones que se ha considerado es la de desarrollar cerdos modificados genéticamente, de esta manera sus órganos serían aceptados por el sistema inmune humano.¹²⁸

El epítipo principal que conduce al rechazo hiperagudo de los xenotransplantes en humanos es un azúcar residual producido por la acción de la enzima $\alpha 1,3$ galactosil transferasa. Esta enzima se encuentra inactiva en humanos y en primates del viejo mundo pero es funcional en todas las demás especies de mamíferos. La unión de los anticuerpos xenoreactivos después del xenotransplante activa la vía del complemento lo que induce a lisis celular casi inmediata (en minutos). Dos estrategias transgénicas para solucionar el problema de rechazo hiperagudo son; bloquear la vía del complemento o reducir los niveles del epítipo xenoreactivo principal, Gal $\alpha 1,3$ Gal.¹³⁷

Se han producido dos líneas transgénicas de cerdos que portan los transgenes que codifican para dos de los tres reguladores principales de la activación del complemento: el factor del decaimiento humano del inglés human decay

accelerating factor (hDAF) y el CD59 humano.^{140,141} En estudios de perfusión, los corazones genéticamente modificados son protegidos de la acción del complemento y después se les transplanta a "monos cinomolgus", los corazones que expresaban hDAF presentaron un incremento en el nivel de sobrevivencia.¹⁴²

Por otra parte, ratones que presentan una disfunción en el locus de la α 1,3 galactosil transferasa, por medio de flanqueo genético son totalmente viables, y se han realizado varios intentos para reducir la actividad de esta enzima en cerdos por medio de transgénesis aditiva.^{128, 140}

Se han generado ratones y cerdos transgénicos que expresan la enzima fucosil transferasa, la cual normalmente no se expresa en estos animales, y su expresión conduce a la reducción de los niveles del epítipo Gal α 1,3 Gal. A pesar de que este método puede controlar la respuesta hiperaguda, no previene el rechazo eventual mediado por linfocitos T, por lo que se deben mejorar los medios de supresión inmunológica o por medio de otras estrategias, en un futuro se podría realizar la humanización del complejo principal de histocompatibilidad porcino, pero esta clase de estrategias dependerá de avances futuros dentro de la ingeniería cromosomal.^{128, 140}

Se han discutido los riesgos que se pueden presentar tras el xenotransplante, ya que estudios *in vitro* han demostrado que las células humanas pueden infectarse con retrovirus endógenos porcinos, pero no se sabe si esto sucede *in vivo*. Por ejemplo se han transplantado islotes pancreáticos provenientes de cerdos a pacientes humanos y no se ha presentado evidencia de infección viral.¹²⁸

12.4.4. MEJORAMIENTO ZOOTÉCNICO

Dentro del área de la agricultura, la primera aplicación de la tecnología de transgénesis aditiva para mejorar el desempeño de los animales de producción fue la introducción de genes extra de GH en un intento de mejorar la velocidad de crecimiento y la conversión alimenticia de los cerdos. Los cerdos resultantes de esta aplicación mostraron un mejoramiento en la conversión alimenticia y contenido de grasa, pero también sufrieron una variedad de defectos debilitantes asociados con la falta de control de la expresión del transgén. Desde entonces las aplicaciones potenciales de la transgénesis en la producción animal han sido ampliamente revisadas, pero raramente se han llevado a la práctica.¹²⁸

Otros experimentos desarrollados son los ovinos diseñados para mejorar la producción de lana, por medio de la transferencia de genes bacterianos que sintetizan cisteína, por la adición de genes que codifican proteínas del tipo de la queratina de la lana, que mejora la ultraestructura de la fibra, o por medio de la expresión del factor de crecimiento - 1, del tipo insulínico en los folículos pilosos.¹²⁸

Otra aplicación dentro del área zootécnica es la resistencia a las enfermedades, se han desarrollado cerdos que expresan bajos niveles del gen Mx1, el cual está asociado con la resistencia a la influenza, se ha sugerido que altas expresiones de este gen podrían ser letales.¹²⁸

Se ha reportado la producción de ovinos que presentan interrupciones en uno de los alelos del gen PrP, que codifica para la proteína priónica (Prion). Los priones son un tipo "relativamente nuevo" de agentes infecciosos que causan encefalopatía espongiforme en los humanos y los animales.¹³⁷

Los ovinos y los bovinos tienen genes PrP funcionales, comúnmente se utilizan estos animales para generar productos biomédicos tales como la gelatina, colágena y cada vez más proteínas humanas como resultado de modificación genética, por lo que sería apropiado producir poblaciones resistentes a los priones.¹³⁷

Un programa exitoso de transgénesis en animales de producción se basaría en el control estricto de la regulación del transgén, en general las aplicaciones zotécnicas de la transgénesis han sido obstaculizadas por la ineficiencia en la producción de animales transgénicos fundadores, los cuales expresen apropiadamente el transgén y de esta manera se podría diseminar el ganado transgénico a poblaciones comerciales.¹²⁸

En los últimos años se ha logrado ampliar el entendimiento de la expresión génica y hasta este momento parece posible que en el futuro varios de los problemas asociados con la expresión inapropiada de los transgenes serán superados.¹²⁸

13. CONCLUSIONES

Durante los últimos 20 años los estudios realizados sobre las células troncales han permitido descubrir desde principios básicos de biología celular hasta los usos potenciales de las mismas, aunque aún queda mucho por descubrir en cuanto a su biología básica, de esta manera se podría lograr obtener el máximo de su potencial, ya que día a día se encuentran nuevas aplicaciones en diversas áreas de las ciencias básicas y aplicadas, por otra parte podrían descubrirse nuevas fuentes de obtención y localización de células troncales.

Aún existen varios aspectos que se desconocen en cuanto a la manera de lograr diferenciar las células troncales embrionarias de manera controlada a tipos específicos de células. Por otro lado, debido a su origen, existen ciertos problemas éticos que han impedido que su uso terapéutico sea aceptado. Por lo que se refiere a las células troncales de adultos, se les han descubierto propiedades que eran totalmente desconocidas y que han puesto en entredicho dogmas de la biología celular y la embriología. El llegar a conocer completamente los mecanismos por los cuales se llevan a cabo los fenómenos de la plasticidad y reprogramación de las células somáticas, generará información invaluable a nivel básico y clínico: Por ejemplo, los principios básicos de la biología de las células troncales podrían aplicarse a entender mejor la oncogénesis. Y tal vez en un futuro, al alcanzar ese nivel de entendimiento, el uso de las células troncales embrionarias como terapia, lo cual es muy controvertido, resulte reemplazado por el uso de células troncales

de adultos.

La terapia con células troncales hematopoyéticas es un área que se ha desarrollado ampliamente desde que se iniciaron los trasplantes de médula ósea, pero aún se debe buscar la forma de mejorar ó hacer más eficiente esta terapia por ejemplo; se podría buscar la forma de separar el efecto que se conoce como "graft *versus* tumor" de la enfermedad "graft *versus* host", para evitar todos los efectos nocivos de dicha enfermedad, también se debería disminuir el uso de los medicamentos que se emplean para el acondicionamiento tratando de encontrar la manera de evitar los rechazos a los trasplantes.

Dentro del área de la Medicina veterinaria se ha reportado la obtención de células troncales de varias especies aunque hasta la fecha, no se ha logrado obtener los mismos resultados que con las células troncales de ratón, como por ejemplo; no se ha logrado producir animales transgénicos por medio de células troncales, por otra parte se ha observado que los animales de producción quiméricos no transmiten esta característica a su descendencia, esto no se ha resuelto debido tal vez a la falta de interés y a que son relativamente pocos los grupos de investigación involucrados en esta área a diferencia del gran interés que existe en el área de la biomedicina, y porque se podría considerar que los costos para producir animales de producción transgénicos es elevado, algo que resulta interesante es la producción de ciertas proteínas logradas a partir de animales transgénicos, ya que de esta manera se podrían producir en mayor proporción, por ejemplo en el ganado lechero. Sin embargo la barrera más grande que se debe superar es el hecho de que la utilización de transgénicos

para consumo humano, aun no es ampliamente aceptada por la comunidad en general, e incluso hay países donde está prohibido por ley, por ello uno de los puntos importantes es el informar a la población de los beneficios reales que ofrece el uso de transgénicos, así como las medidas de seguridad que se toma al usarlos. Esto a su vez permitirá que haya una mejor y más eficiente legislación al respecto.

Existen grupos de investigación que actualmente están realizando experimentos de terapia génica en animales de compañía utilizando como vectores las células troncales, estos grupos trabajan en asociación con hospitales importantes y se espera que los conocimientos adquiridos a partir de la experimentación en animales puedan ser aplicados en los seres humanos.

Considerando los usos y aplicaciones actuales y futuros de estas células, se puede concluir que este tema es de gran importancia no sólo dentro del área médica, sino también dentro del área veterinaria.

14. GLOSARIO

ADN Recombinante: moléculas de ADN creadas por la fusión de ADN de diferentes fuentes. Es la tecnología empleada para empalmar ADN de diferentes fuentes y para amplificar el ADN heterogéneo resultante.

Alogénico: variación de los alelos en miembros de la misma especie.

Apoptosis: muerte celular programada, es el método normal por el cual se desechan las células dañadas ó no necesarias.

Asimetría poblacional: en este proceso una célula troncal da origen a células hijas que cuentan con la probabilidad finita de ser, ya sea células troncales ó células progenitoras comprometidas en cierta ruta de desarrollo, comúnmente una célula troncal da origen a otra célula troncal y a una célula hija comprometida, pero la asimetría en este caso se presenta según bases poblacionales y no en sentido individual. La asimetría poblacional facilita la respuesta a las necesidades fisiológicas, de los individuos.

Asimétrica constante: es el proceso mediante el cual una célula troncal da origen a una célula troncal hija y a otra célula que experimentará división celular.

Caspasas: es una familia heterogénea de cisteína proteasas cuya característica en común es su aptitud de desdoblar proteínas después del residuo aspartato. Éstas son parte de las vías de señalización y se organizan en una cascada jerárquica.

Cateninas: proteínas asociadas con el dominio citoplasmático de una glicoproteína (uvomorulin) e implicadas probablemente con la unión al citoesqueleto (alfa-catenina, beta-catenina y gamma-catenina).

Células alimentadoras: (capa alimentadora): son células que han sido tratadas previamente con la finalidad de impedir su división celular, también liberan al medio de cultivo importantes factores de crecimiento que permiten a las células troncales embrionarias crecer y permanecer no diferenciadas.

Citocromos: son hemoproteínas cuya forma característica de actuar implica la transferencia de equivalentes reducidos asociados con un cambio reversible en el estado de oxidación del grupo hemo.

Clona: es una réplica genética exacta de una molécula de ADN, célula, tejido, órgano ó un organismo animal o vegetal completo. Es un organismo que tiene el mismo genoma nuclear que otro organismo.

Elemento potenciador ó estimulador: secuencia de ADN que está limitado por proteínas reguladoras que estimula el índice de transcripción de un gen que puede estar a miles de pares de bases de la secuencia del elemento potenciador.

Estado epigenético: cambio en algún carácter morfológico como resultado de influencias localizadas diferentes al patrón normal ó usual que ocurre después de que el desarrollo de un organismo es iniciado, es un término que se usa en relación a los cambios que resultan de estudios embriológicos de los animales.

Factores de transcripción: son proteínas de las células eucariontes que regulan la transcripción de otros genes uniéndose a secuencias regulatorias del gen, interactuando con la ARN polimerasa.

Factores transactuantes: la expresión genética se regula por la interacción de proteínas específicas (factores transactuantes), con secuencias cortas de nucleótidos, en la región promotora del gen.

Flanqueo de genes ó Gene targeting: es la inactivación selectiva de un gen. Esta estrategia se utiliza para delinear ó delimitar la función de un gen. Es una técnica para colocar una nueva secuencia de ADN en una posición predeterminada y precisa de un cromosoma.

Heterocarión: es una célula que tiene dos ó más núcleos diferentes genéticamente.

Lipofección: procedimiento mediante el cual ADN exógeno es introducido a células eucariontes por medio de liposomas.

Locus (loci, plural): es una posición específica de un gen u otro marcador cromosomal.

Marcador de selección: es un gen que permite la presencia de un vector (que porta el gen exógeno) para ser identificado en células eucariontes o procariontes, por ejemplo el gen neo (resistencia a la neomicina) y el gen amp (resistencia a la ampicilina). Sólo las células que portan el marcador de selección pueden crecer en la presencia del fármaco apropiado (los antibióticos neomicina ó ampicilina, respectivamente).

Metilación: es un proceso bioquímico que involucra la adición de grupos químicos metilo (-CH₃) al ADN. La metilación puede ser una señal para un gen ó una sección de un cromosoma para apagar la expresión del gen e inactivarlo.

Molécula de señalización: son moléculas producidas y liberadas por células que afectan la actividad de otras células, las moléculas de señalización permiten a las células comunicarse entre ellas.

Oncogén: es un gen cuyo producto proteínico causa crecimiento celular incontrolado. Las células normales se dividen bajo un programa específico llamado ciclo celular que está controlado por varios genes.

Probe: cualquier bioquímico marcado de alguna forma, la cual permite utilizarlo para identificar ó aislar un gen, ARN ó proteína.

Proteína recombinante: es una proteína creada usando la tecnología del ADN recombinante.

Región promotora: se define como el estiramiento del ADN en dirección contraria al gen y que es reconocida por la ARN polimerasa. Las regiones promotoras se identifican por su observada función biológica.

Regiones controladoras de locus: son secuencias, que tienen un efecto activador dominante sobre la transcripción en los dominios largos de cromatina.

Singénico: literalmente significa del mismo genotipo.

Southern blotting: es un procedimiento utilizado para la identificación de ADN por medio de la transferencia de un fragmento aislado en un gel de agarosa a un papel de nitrocelulosa, dónde dicho fragmento puede ser hibridado con una secuencia complementaria "probe".

Transfección: es el acto de introducir ADN exógeno dentro de una célula huésped.

Transformación celular: proceso genético que resulta en una alteración heredable de las propiedades de una célula. En el caso de células cultivadas, la transformación frecuentemente se refiere a la adquisición de nuevas propiedades, tales como expansión celular indefinida en medio de cultivo.

Transgénesis: método por el cual se pueden introducir genes exógenos (no propios) dentro del genoma de un organismo.

Transgén: es un gen exógeno que se introduce en una célula o en un organismo completo, con fines terapéuticos ó experimentales.

Tratamiento mieloablativo: tratamiento basado en medicamentos quimioterapéuticos (agresivos y tóxicos para la médula ósea) que se utiliza antes de realizar trasplantes de médula ósea, con la finalidad de evitar el rechazo al trasplante.

15. ABREVIATURAS

TGF (Transforming Growth Factor): factor de crecimiento transformante.

BMP (Bone Morphogenetic Protein): proteína morfogenética de hueso.

LIF (Leukemia Inhibitory Factor): factor inhibidor de la leucemia.

SCL (Stem Cell Leukaemia): leucemia célula troncal.

Tcf (T-cell factor): factor de células T.

Lef (Lymphoid enhancing factor): factor de incremento linfoide.

CDK p27/Kipl (Cyclin Dependent Kinases p27): Ciclina dependiente de cinasas p27.

CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) factor neurotrófico ciliar.

PTC (Primitive Teratocarcinoma Cell): células primitivas de teratocarcinoma.

DTC (Differentiated Type Cells): células con tipo diferenciado.

ES (Embryonic Stem): células troncales embrionarias.

EDTA: Etilen diamino tetracetato de sodio.

TDGF-1 (Teratocarcinoma-Derived Growth Factor-1): factor de crecimiento derivado de teratocarcinoma.

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) medio Eagle modificado por Dulbecco.

CPD-A (Citrate/Phosphate/Dextrose/Adenine) citrato, fosfato, dextrosa, adenina.

MAPC (Multipotent Adult Progenitor Cells): células progenitoras multipotenciales adultas.

HLA (Human Leukocyte Antigen): Antígeno leucocitario humano.

TNF (Tumor Necrosis Factor): factor de necrosis tumoral.

GvT (Graft *versus* Tumor): transplante contra tumor.

GvH (Graft *versus* Host): transplante contra hospedero.

GvHD (Graft *versus* Host Disease): enfermedad transplante contra hospedero.

GvL (Graft *versus* Leukemia): transplante contra leucemia.

GFP (Green Fluorescent Protein): proteína verde fluorescente.

16. BIBLIOGRAFÍA:

1. Iáñez E. Células madre y clonación terapéutica. Departamento de Microbiología e Instituto de Biotecnología. 2000, URL: <http://www.~eianez/Biotecnologia/clonembrion.htm>
2. Heinz, K. Cellules souches: un espoir pour la médecine. Tribune libre Campus 2002; 58: 2.
3. Prella K, Zink N, Wolf E. Pluripotent stem cells—model of embryonic development, tool for gene targeting, and basis of cell therapy. *Anat Histol Embryol.* 2002; 31:169–186.
4. Pierce GB, Dixon FJ, Verneve EL. Teratocarcinogenic and tissue forming potentials of the cell types comprising neoplastic embryoid bodies. *Lab Invest* 1960; 9: 583–602.
5. Kleinsmith LJ, Pierce GB. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res* 1964; 24: 1544–1551.
6. Cole RJ, Edwards RG, Paul J. Cytodifferentiation and embryogenesis in cell colonies and tissue cultures derived from ova and blastocysts of the rabbit. *Dev Biol* 1966; 13(3):385–407.
7. Gardner RL. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature* 1968; 220(167):596–597.
8. Edwards RG, Bavister BD, Steptoe PC. Early stages of fertilization in vitro of human oocytes matured in vitro. *Nature* 1969; 221(181):632–635.

9. Steptoe PC, Edwards RG. Laparoscopic recovery of preovulatory human oocytes after priming of ovaries with gonadotrophins. *Lancet* 1970;1(7649):683-689.
10. Steptoe PC, Edwards RG, Purdy JM. Human blastocysts grown in culture. *Nature* 1971; 229(5280):132-133.
11. Artzt K, Dubois P, Benett D, Condamine H, Babinet C, Jacob F. Surface antigens common to mouse cleavage embryos and primitive teratocarcinoma cells in culture. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1973; 70: 2988-2992.
12. Martin GR, Evans MR. The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell* 1974; 2: 163-172.
13. Martin GR, Evans MR. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1975; 72: 1441-1445.
14. Mintz B, Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc. Nat. Acad. Sci* 1975; 72: 3585-3589.
15. Evans MJ, Kaufman MH. establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-156.
16. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1981; 78: 7634-7638.

17. Bradley A, Evans M, Kaufman HM, Robertson E. Formation of germ line chimaeras from embryo derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 1984; 309: 255-256.
18. Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling E, Kemler R. transgénésis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1986; 83: 9065-9069.
19. Eistetter, H.R. Pluripotent embryonal stem cell lines can be established from disaggregated mouse morula. *Dev. Growth & Differ.* 1987; 31: 275-282.
20. Thomas KR, Capecchi MR. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet.* 1987; 5: 70-76.
21. Hollands P. Differentiation and grafting of hematopoietic stem cells from early postimplantation mouse embryos. *Development* 1987; 99: 69-76.
22. Hollands P. Transplantation of embryonic hematopoietic stem cells without prior recipient X-irradiation. *British Journal of Haematology* 1988; 69: 437-440.
23. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. Myeloid leukemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988; 336: 684-687.
24. Gearing DP, Nicola NA, Metcalf D, Foote S, Willson TA, Gough M, Williams RL. Production of leukemia inhibitory factor in *Escherichia coli* by a novel procedure and its use in maintaining embryonic stem cells in culture. *Biotechnology* 1989; 7: 1157-1161.

25. Pease S, Braghetta P, Gearing DP, Grail D, Williams RL. Isolation of embryonic stem cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor. *Dev. Biol.* 1990; 141: 244–352.
26. Kovacs MS, Lowe L, Kuehn MR. Use of superovulated mice as embryo donors for embryonic stem cell injection chimeras. *Lab Animal Science.* 1993; 43: 91–93.
27. Wood S A, Allen ND, Rossant J, Auerbach A, Nagy A. Non-injection methods for the production of embryonic stem cell embryo chimeras. *Nature* 1993; 365: 87–89.
28. Iannaccone PM, Taborn GU, Garton RL, Caplice MD, Brenin DR. Pluripotent embryonic stem cells from the rat are capable of producing chimeras. *Dev. Biol.* 1994; 163: 288–292.
29. Schoonjans MJ, Albright GM, Li J, Collen D. Pluripotent rabbit embryonic stem cells are capable of forming over coat color chimeras following injection into blastocysts. *Mol. Reprod. Dev.* 1996; 45: 439–443.
30. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145–1147.
31. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR and Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 23:13726–13731.

32. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca J, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak D. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284, 143–147.
33. National Institutes of Health. Stem cells: A Primer. 2002. URL: <http://www.nih.gov/news/stemcells/primer.htm>
34. National Institutes of Health. Stem cells: A Primer. 2000. URL: <http://www.nih.gov/news/stemcells/primer.htm>
35. O'Shea, K.S. Embryonic stem cells models of Development. *The Anatomical Record* 1999; 257: 32–41.
36. Van der Kooy D, Weiss S. Why Stem Cells?. *Science* 2000; 287: 1439–1441.
37. Gage FH. Mammalian Neural Stem Cells. *Science* 2000; 287: 1433–1438.
38. Pesce M, Anastassiadis K, Scholer HR. Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* 1999; 165:144–152.
39. National Institutes of Health. Stem cell Markers. 2001; URL: <http://www.nih.gov/news/stemcell/appendix.pdf>
40. Shambloott MJ, Axelman J, Littlefield JW, Blumenthal PD, Huggins GR, Cui Y, Cheng L, Gearhart JD. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98(1):113–118.
41. Laslett AL, Filipczyk AA, Pera MF. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Trends Cardiovasc Med*. 2003; 13(7): 295–301.
42. Rizzino A. Embryonic stem cells provide a powerful and versatile model system. *Vitam Horm*. 2002; 64:1–42

43. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM. Stem Cells: Hype and Reality. *Hematology* 2002; 369–391.
44. Gratwohl A, Passweg J, Kühne T, Tyndall A, Holzgreve W, Skoda R, Marbet G, Tichelli A. Transplantation de cellules souches hématopoïétiques. *Forum Med. Suisse* 2002; 25: 597–606.
45. Díaz MA, Sevilla J, De la Rubia J, Verdeguer A, Espigado I, Vincent MG, Pascual MJ et al. Factors predicting peripheral blood progenitor cell collection from pediatric donors for allogenic transplantation. *Haematologica* 2003; 88(08): 919–922.
46. Nexell Therapeutics, Inc. Isolex Magnetic Cell Selection System 1999; Irvine California 92618 USA, No. Patente 120968.
47. Rowley SD, Loken M, Radich J, Kunkle LA, Mills BJ, Gooley T, Holmberg L, McSweeney P, Beach K, MacLeod B, Appelbaum F, Bensinger WI. Isolation of CD34+ cells from blood stem cell components using the Baxter Isolex system. *Bone Marrow Transplantation* 1998; 21(12): 1253–1262.
48. Belvedere O, Feruglio C, Malangone W, Bonora ML, Donini A et al. Phenotypic Characterization of Immunomagnetically Purified umbilical Cord Blood CD34+ Cells. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 1999; 25(9): 140–145.
49. Pasino M, Lanza T, Marotta F, Scarso L, De Biasio P, Amato S, Corcione A et al. Flow Cytometric and functional characterization of AC133+ cells from human umbilical cord blood. *British Journal of Haematology* 2000; 108: 793–800.

50. Avital A, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferrareso C, Rozga J, Arnaout WS, Demetriou A A. Isolation, Characterization and Transplantation of Bone Marrow-Derived Hepatocyte Stem Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 288: 156–164.
51. Nunes MC, Roy NS, Keyoung HM, Goodman RR, McKhann G 2nd, Jiang L, Kang J, Nedergaard M, Goldman SA. Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med.* 2003; 9(4): 439–447.
52. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; 287(5457): 1427–1430.
53. Katoh M, Katoh M. Identification and characterization of human Inscuteable gene in silico. *Int J Mol Med.* 2003; 11: 111–116.
54. Cheong C, Hong KU, Lee HW. Mouse models for telomere and telomerase biology. *Exp Mol Med.* 2003; 35(3): 141–153.
55. Ruiz AA, Sánchez P, Dahmane N. Gli and Hedgehog in Cancer: Tumours, Embryos and Stem Cells. *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 361–372.
56. Tsai RY, Kittappa R, McKay RDG. Plasticity, Niches and the Use of Stem Cells. *Developmental Cell* 2002; 2: 707–712.
57. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R. Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 2003; 423(6938): 448–452.
58. Kim SJ, Letterio J. Transforming growth factor-beta signaling in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia* 2003;17(9): 1731–1777.

59. Niwa H, Molecular Mechanism to Maintain Stem Cell Renewal of ES Cells. *Cell Structure and Function* 2001; 26: 137-148.
60. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003; 374: 1-20.
61. Lowell S, Jones P, Le Roux I, Dunne J, Watt FM. Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters. *Curr Biol.* 2000; 10: 491-500.
62. Altman J. Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol.* 1969;137: 433-457.
63. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999; 97: 703-716.
64. Johansson CB, Momma S, Clarke DL, Risling M, Lendahl U, Frisen J. Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system. *Cell* 1999; 96: 25-34.
65. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 1996; 273(5272):242-245.
66. Slack JM. Stem cells in epithelial tissues. *Science* 2000; 287(5457): 1431-1433.

67. Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; Colloquium 1–6.
68. Potten CS, Booth C. Keratinocyte Stem Cells: a Commentary. *J. Invest. Dermatol.* 2002; 119: 888–899.
69. Andrews RG, Briddell RA, Knitter GH, Rowley SD, Appelbaum FR, McNiece IK. Rapid engraftment by peripheral blood progenitor cells mobilized by recombinant human stem cell factor and recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in nonhuman primates. *Blood* 1995; 85: 15–20.
70. McKinney-Freeman SL, Jackson KA, Camargo FD, Ferrari G, Mavilio F, Goodell MA. Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(3): 1341–1346.
71. Oh SH, Miyazaki M, Kouchi H, Inoue Y, Sakaguchi M, Tsuji T, Shima N, Higashio K, Namba M. Hepatocyte growth factor induces differentiation of adult rat bone marrow cells into a hepatocyte lineage in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 279(2): 500–504.
72. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385(6619): 810–813.
73. Tang DG, Tokumoto YM, Apperly JA, Lloyd AC, Raff MC. Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cells. *Science* 2001; 291: 868–871.
74. Suzuki A, Zheng YY, Kaneko S, Onodera M, Fukao K, Nakauchi H, Taniguchi H. Clonal identification and characterization of self-renewing pluripotent stem cells in the developing liver. *J Cell Biol.* 2002; 156: 173–184.

75. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418: 41–49.
76. Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, Sharkis SJ. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105(3): 369–377.
77. Grant MB, May WS, Caballero S, Brown GA, Guthrie SM, Mames RN, Byrne BJ, Vaught T, Spoerri PE, Peck AB, Scott EW. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med*. 2002; 8(6): 607–612.
78. Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, Veress B, Nilsson E, Karlstrom H, Lendahl U, Frisen J. Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000; 288 (5471): 1660–1663.
79. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 1999; 283(5401): 534–537.
80. Eglitis MA, Mezey E. Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice. *Proc Natl Acad Sci USA*.; 94(8): 4080–4085.

81. Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, Boggs SS, Greenberger JS, Goff JP. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284(5417): 1168–1170.
82. Storb R. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation—yesterday, today, and tomorrow. *Exp Hematol.* 2003; 31: 1–10.
83. Joshi SS, Tarantolo SR, Kuszynski CA, Kessinger A. Antitumor therapeutic potential of activated human umbilical cord blood cells against leukemia and breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(11): 4351–4358.
84. Thomas ED. Bone marrow transplantation: a review. *Semin Hematol.* 1999; 36: 95–103.
85. Negrin RS, Atkinson K, Leemhuis T, Hanania E, Juttner C, Tierney K, Hu WW, Johnston LJ, Shizurn JA, Stockerl-Goldstein KE, Blume KG, Weissman IL, Bower S, Baynes R, Dansey R, Karanes C, Peters W, Klein J. Transplantation of highly purified CD34+Thy-1+ hematopoietic stem cells in patients with metastatic breast cancer. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2000; 6(3): 262–271.
86. Ferrara JL, Cooke KR, Pan L, Krenger W. The immunopathophysiology of acute graft-*versus*-host-disease. *Stem Cells* 1996; 14(5): 473–489.
87. Aksentijevich I, Flinn I. Chemotherapy and bone marrow reserve: lessons learned from autologous stem cell transplantation. *Cancer Biother Radiopharm.* 2002; 17(4): 399–403.

88. Kenney LB, Laufer MR, Grant FD, Grier H, Diller L. High risk of infertility and long term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood. *Cancer* 2001; 91(3): 613-621.
89. Posada MN, Kolp L, García JE. Fertility options for female cancer patients: facts and fiction. *Fertility and Sterility* 2001; 75(4): 647-653.
90. Flowers ME, Parker PM, Johnston LJ, Matos AV, Storer B, Bensinger WI, Storb R, Appelbaum FR, Forman SJ, Blume KG, Martin PJ. Comparison of chronic graft-*versus*-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood* 2002; 100(2): 415-419.
91. Barrett AJ. Mechanisms of the graft-*versus*-leukemia reaction. *Stem Cells* 1997; 15(4): 248-258.
92. Childs RW. Immunotherapy of solid tumors: nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation. *MedGenMed.* 2002; 4(3): 13-17.
93. Eibl B, Schwaighofer H, Nachbaur D, Marth C, Gachter A, Knapp R, Bock G, Gassner C, Schiller L, Petersen F, Niederwieser D. Evidence for a graft-*versus*-tumor effect in a patient treated with marrow ablative chemotherapy and allogeneic bone marrow transplantation for breast cancer. *Blood* 1996; 88(4): 1501-1508.
94. Borlongan CV, Sanberg PR. Neural Transplantation for treatment of Parkinson's disease. *Drugs Discovery Today* 2002; 7(12): 674-682.

95. Bjorklund LM, Sanchez-Pernaute R, Chung S, Andersson T, Chen IY, McNaught KS, Brownell AL, Jenkins BG, Wahlestedt C, Kim KS, Isacson O. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(4): 2344–2349.
96. Schuldiner M, Eiges R, Eden A, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Goldstein RS, Benvenisty N. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res.* 2001; 913(2): 201–205.
97. Jong-Hoon K, Auerbach JM, Rodríguez-Gómez JA, Velasco I, Gavin D, Lumelsky N, Sang-Hun L, Nguyen J, Sánchez-Pernaute R, Bankiewicz K, McKay R. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002; 418: 50 – 56.
98. Studer L, Tabar V, McKay RD. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci.* 1998; 1(4): 290–295.
99. Raisman G. Olfactory ensheathing cells – another miracle cure for spinal cord injury?. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2(5): 369–375.
100. Liu S, Qu Y, Stewart TJ, Howard MJ, Chakraborty S, Holekamp TF, McDonald JW. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(11): 6126–6131.

101. Saporta S, Kim JJ, Willing AE, Fu ES, Davis CD, Sanberg PR. Human umbilical cord blood stem cells infusion in spinal cord injury: engraftment and beneficial influence on behavior. *J Hematother Stem Cell Res.* 2003; 12(3): 271–278.
102. Hoehn M, Kustermann E, Blunk J, Wiedermann D, Trapp T, Wecker S, Focking M, Arnold H, Hescheler J, Fleischmann BK, Schwandt W, Buhle C. Monitoring of implanted stem cell migration in vivo: a highly resolved in vivo magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(25): 16267–16272.
103. Berná G, León-Quinto T, Enseñat-Waser R, Montanya E, Martín F. Stem cells and Diabetes. *Biomed Pharmacother* 2001; 55: 206–212.
104. Soria B, Roche E, Berna G, Leon-Quinto T, Reig JA, Martin F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000; 49(2): 157–162.
105. Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science.* 2001; 292(5520): 1389–1394.
106. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 2001; 107(11): 1395–1402.

107. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Transplanted adult bone marrow cells repair myocardial infarcts in mice. *Ann N Y Acad Sci.* 2001 Jun;938:221–229.
108. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(18): 10344–10349.
109. Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, Yasue H, Tsunoda Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998; 282(5396): 2095–2098.
110. Wakayama T, Perry AFC, Zucotti M, Johnson KR, Yanagimachi R. Full Term of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394: 369–374.
111. Onishi A, Iwamoto M, Akita T, Mikawa S, Takeda K, Awata T, Hanada H, Perry AC. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei. *Science* 2000; 289(5482): 1188–1190.
112. Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 2000; 407(6800): 86–90.
113. Tada T, Tada M. Toti-/pluripotential Stem Cells and Epigenetic Modifications. *Cell Structure and Function* 2001; 26: 149–160.
114. Singh P. Understanding Nuclear Reprogramming. *Research Reviews* 2000; 10: 53–58.

115. Howell CY, Bestor TH, Ding F, Latham KE, Mertineit C, Trasler JM, Chaillet JR. Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell* 2001; 104(6): 829–838.
116. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature*. 2001; 414(6859): 118–121.
117. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science* 2002; 295(5557): 1009–1014.
118. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987; 84(8): 2302–2306.
119. Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittinger M. Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften*. 2002; 89(8): 338–351.
120. Wakitani S, Imoto K, Yamamoto T, Saito M, Murata N, Yoneda M. Human autologous culture expanded bone marrow mesenchymal cell transplantation for repair of cartilage defects in osteoarthritic knees. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10(3): 199–206.
121. Juncosa N, West JR, Galloway MT, Boivin GP, Butler DL. In vivo forces used to develop design parameters for tissue engineered implants for rabbit patellar tendon repair. *J Biomech*. 2003; 36(4): 483–488.
122. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*. 1998; 16(4): 406–413.

123. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414(6859): 105–111.
124. You Z, Saims D, Chen S, Zhang Z, Guttridge DC, Guan KL, MacDougald OA, Brown AM, Evan G, Kitajewski J, Wang CY. Wnt signaling promotes oncogenic transformation by inhibiting c-Myc-induced apoptosis. *J Cell Biol.* 2002; 157(3): 429–440.
125. Purity M, Hadjantonakis AK, Nagy A. Embryonic stem cells, creating transgenic animals. *Methods Cell Biol.* 1998; 57: 279–293.
126. Charreau B, Tesson L, Soulillou JP, Pourcel C, Anegon, I. transgenesis in rats: technical aspects and models. *transgenic Research* 1996; 5: 223–234.
127. Williams RS, Wagner PD. transgenic animals in integrative biology: approaches and interpretations of outcome. *J Appl Physiol.* 2000; 88: 1119–1126.
128. McWhir J. Biomedical and agricultural applications of animal transgenesis. *Methods Mol Biol.* 2002; 180: 3–23.
129. Mansouri A. Knockout and Knock-in Animals. *Encyclopedia of Life Sciences*, London: Nature Publishing Group, <http://www.els.net/doi:10.1038/npg.els.0000991>
130. Gertsenstein M, Lobe C, Nagy A. ES cell-mediated conditional transgenesis. *Methods Mol Biol.* 2002; 185: 285–307.
131. Kerr DE, Liang F, Bondioli KR, Zhao H, Kreibich G, Wall RJ, Sun TT. The bladder as a bioreactor: urothelium production and secretion of growth hormone into urine. *Nat Biotechnol.* 1998; 16(1): 75–79.

132. McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KH, Colman A, Schnieke AE, Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature* 2000; 405(6790): 1066–1069.
133. Ziomek CA. Commercialization of proteins produced in the mammary gland. *Theriogenology* 1998; 49(1): 139–144.
134. Pollock DP, Kutzko JP, Birck-Wilson E, Williams JL, Echelard Y, Meade HM. Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. *J Immunol Methods*. 1999; 231: 147–157.
135. Van Berkel PH, Welling MM, Geerts M, van Veen HA, Ravensbergen B, Salaheddine M, Pauwels EK, Pieper F, Nuijens JH, Nibbering PH. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nat Biotechnol*. 2002; 20(5): 484–487.
136. Brophy B, Smolenski G, Wheeler T, Wells D, L'Huillier P, Laible G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *Nat Biotechnol*. 2003; 21(2): 157–162.
137. Denning C, Priddle H. New frontiers in gene targeting and cloning: success, application and challenges in domestic animals and human embryonic stem cells. *Reproduction*. 2003; 126: 1–11.
138. Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis. A historical overview. *Life Sciences* 2002; 70: 855–865.
139. Harris A. Towards an ovine model of cystic fibrosis. *Hum Mol Genet*. 1997; 6(13): 2191–2194.

140. Ramsland PA, Farrugia W, Yuriev E, Edmundson AB, Sandrin MS. Evidence for structurally conserved recognition of the major carbohydrate xenoantigen by natural antibodies. *Cell Mol Biol* 2003; 49(2): 307-317.
141. Mollnes TE, Fiane AE. Perspectives on complement in xenotransplantation. *Mol Immunol*. 2003; 40: 135-143.
142. Cooper DK. Clinical xenotransplantation-how close are we?. *Lancet* 2003; 362(9383): 557-559.