

Revista de Endocrinología y Nutrición

Volumen 13
Volume

Número 3
Number

Julio-Septiembre 2005
July-September

Artículo:

Posible uso terapéutico de las células
troncales embrionarias como fuente de
células β pancreáticas

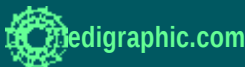
Derechos reservados, Copyright © 2005:
Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología, AC

Otras secciones de
este sitio:

- 👉 [Índice de este número](#)
- 👉 [Más revistas](#)
- 👉 [Búsqueda](#)

*Others sections in
this web site:*

- 👉 [Contents of this number](#)
- 👉 [More journals](#)
- 👉 [Search](#)





Actualidades terapéuticas

Posible uso terapéutico de las células troncales embrionarias como fuente de células β pancreáticas

Fabián Díaz,* Iván Velasco,** Ignacio Camacho-Arroyo*

* Facultad de Química, UNAM.

** Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Correspondencia:

Dr. Ignacio Camacho-Arroyo
Facultad de Química,
Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México
Tel. 5622-3098 Fax. 5616-2010
E-mail: igcamacho55@hotmail.com
Dr. Iván Velasco Velázquez
Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México
AP 70-253, México, D.F.
04510, Tel.: 5622-5649 Fax: 5622-5607
Email:ivehsco@ifc.unam.mex

Fecha de recepción: 19-Octubre-2005

Fecha de aceptación: 21-Octubre-2005

Resumen

Las células troncales embrionarias (CTE) son células pluripotentes, es decir, mantienen la capacidad para diferenciarse a todos los tejidos que forman un embrión. Las CTE son obtenidas de la masa celular interna de un estadio embrionario muy temprano denominado blastocisto. Las CTE pueden ser mantenidas y expandidas como células indiferenciadas por grandes períodos de tiempo en cultivo, sin sufrir alteraciones genéticas. Estas células pluripotentes se han propuesto como una fuente potencial de células para terapias de reemplazo sustitutivo en el humano, debido a las características antes mencionadas. Las CTE pueden ser utilizadas también como un modelo novedoso para estudiar en detalle los procesos de desarrollo y función en el organismo. Así, las CTE han llamado poderosamente la atención en los campos de la medicina y la biología. En este trabajo de revisión nos enfocamos en describir la diferenciación de CTE de ratón y de humano a células que producen y secretan insulina, y el efecto que tiene su trasplante en modelos animales de diabetes dependiente de insulina (tipo I).

Palabras clave: Células troncales embrionarias, diferenciación, célula β pancreática, terapia celular, diabetes.

Revista de Endocrinología y Nutrición 2005;13(3):132-139.

Abstract

Pluripotent embryonic stem (ES) cells can differentiate into all intraembryonic cells types. They are derived from the inner cell mass of pre-implantation embryos called blastocysts. ES cells can be grown undifferentiated in culture for extended periods of time with genetic stability. These pluripotent cells could become a useful source for cells aimed for cell replacement therapies in people, because of the above-mentioned characteristics. ES cells also represent a valuable model system to study in detail developmental processes and cell function. Thus, ES cells have recently gained a lot of interest in Medicine as well as in Biology. In this review, we summarize methods for the differentiation of mouse and human ES cells to progeny that synthesize and release insulin, and their effect upon grafting in animal models of type I Diabetes.

Key words: Embryonic stem cells, differentiation, pancreatic β cells, cell therapy, diabetes.
Revista de Endocrinología y Nutrición 2005;13(3):132-139.

Abreviaturas. BMP: Proteínas morfogénicas de hueso; CCE: Células del carcinoma embrionario; CE: Cuerpos embrionarios; CTE: Células troncales embrionarias; EGF: Factor de crecimiento epidérmico; FER: Fibroblastos provenientes de embriones de ratón; FGF: Factor de crecimiento fibroblástico; HGF: Factor de crecimiento hepático; LIF: Factor inhibidor de leucemia; MCI: Masa celular interna; NGF: Factor de crecimiento neuronal; TGF β : Factor de crecimiento tumoral β .

INTRODUCCIÓN

CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENCIALES

En 1970 se reportó un hallazgo sorprendente: al trasplantar embriones de ratón de 3 y 6 días en la cápsula renal o en los testículos de animales adultos de la misma

cepa, se producían teratocarcinomas, los cuales son tumores multidiferenciados. Esto abrió un nuevo campo de investigación en biología del desarrollo.^{1,2} Así mismo, se demostró que los teratocarcinomas en el adulto, pudieron cultivarse para generar células llamadas de carcinoma embrionario (CCE); las líneas derivadas de estas células pueden ser expandidas en un estado diferenciado y se pueden diferenciar *in vivo* e *in vitro*.

Cabe señalar que los clones de CCE, aislados y expandidos, retienen la capacidad para diferenciarse y producir derivados de las 3 capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo, razón por la cual se denominaron células pluripotenciales. Se ha especulado que el origen de las CCE es otro tipo de células pluripotenciales, las llamadas germinales embrionarias (EG por sus iniciales en inglés), que se derivan de las células primordiales germinales embrionarias.³

Para evitar los altos riesgos que implica el crecimiento de teratocarcinomas en los animales, el siguiente paso fue el cultivo *in vitro* de células embrionarias de ratón. En 1981, dos grupos aislaron líneas celulares pluripotentes del blastocisto de ratón, Evans y Kaufman (1981) emplearon una capa de células nodrizas de fibroblastos provenientes de embriones de ratón (FER),⁴ mientras que el grupo de Martin usó un medio condicionado de CCE.⁵ De esta forma, lograron aislar células embrionarias de la masa celular interna (MCI), a las cuales les dieron el nombre de CTE. Estas células pueden ser mantenidas *in vitro* sin una pérdida aparente de su potencial de diferenciación. De esta forma, las CTE presentan características semejantes, tanto en su morfología, crecimiento y expresión de marcadores, a las CCE. Esta conexión se extiende también a la capacidad de producir teratocarcinomas.

La naturaleza pluripotente de las CTE de ratón quedó demostrada al inyectarse en blastocistos de la misma especie y observar su capacidad de contribuir (es decir, diferenciarse) a todos los tejidos del animal adulto, incluyendo la línea germinal.⁶ Además de su potencial capacidad de desarrollar cualquier tejido *in vivo*, las CTE muestran una facultad extraordinaria de formar células diferenciadas también en cultivo.⁷

La producción de líneas de CTE de ratón se inició en la década de 1980.⁸ En general, los métodos utilizados fueron muy semejantes, los cuales consistían en primer lugar aislar y cultivar las células de los embriones preimplantados sobre FER, seguido por la expansión de las CTE hasta que alcancen la confluencia en la caja de cultivo, posteriormente estas células son disociadas (generalmente con proteasas) y finalmente pueden ser pasadas a otra caja de cultivo. Una vez que se establecieron las condiciones ideales para propagar a las CTE murinas, éstas mostraron una capacidad de proliferación ilimitada *in vitro* y mantuvieron su potencial de contribuir a todos

los linajes celulares, además de mantener un cariotipo estable aun con el subcultivo sucesivo.

Esta habilidad de las CTE de diferenciarse a múltiples linajes celulares abre la posibilidad de desarrollar nuevos conocimientos, no sólo en el campo de la medicina, sino en el estudio del desarrollo embrionario de los mamíferos *in vitro*, como puede ser el análisis de los eventos que regulan las etapas tempranas tanto de inducción como especificación de los diferentes tipos celulares. Así mismo, el sistema de diferenciación de las CTE puede ser visto como un modelo novedoso que aporta conocimientos valiosos para la obtención de fuentes ilimitadas de células y tejidos que podrían ser utilizadas como fuentes de trasplante en el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades.

Debido a que la producción de CTE requiere una monocapa de FER inactivados, este hallazgo sugirió que los fibroblastos podrían producir factor(es) crítico(s) para la auto-renovación, o ser capaces de inhibir la diferenciación. De esta forma, dos grupos independientes identificaron al factor inhibidor de leucemia (LIF), como el factor necesario para mantener el estado óptimo a las CTE de ratón.^{9,10} LIF es una glicoproteína soluble de la familia de la interleucina 6, la cual actúa uniéndose al receptor de membrana gp130 para regular una variedad de funciones celulares a través de la vía de señalización de la proteína STAT.¹¹ De esta manera, tanto la ausencia de LIF, como eliminar a los FER o inactivar a STAT3, tiene como consecuencia que las CTE se diferencien *in vitro*.¹²

El reconocimiento de la identidad de las CTE se ha logrado mediante el uso de marcadores moleculares y de superficie celular que son casi exclusivos de este tipo de células. Se ha descrito que las CTE de ratón indiferenciadas expresan SSEA-1,¹³ receptores de membrana gp130,¹⁴ poseen actividad de fosfatasa alcalina⁸ y de telomerasa.¹⁵

Por otra parte, se han descrito una serie de factores necesarios para que las CTE mantengan sus propiedades pluripotenciales. En primera instancia, está el factor de transcripción Oct-3/4, ya que un incremento en su nivel de expresión causa la diferenciación hacia endodermo y mesodermo, mientras su disminución induce la formación de trofoectodermo en las CTE.¹⁶ El factor transcripcional Nanog juega un papel determinante, ya que puede mantener la auto-renovación de las CTE de ratón independientemente de la vía de LIF; además, la eliminación del gen nanog tiene como consecuencia la pérdida de la pluripotencialidad de las CTE murinas.¹⁷

Las CTE humanas, comparten ciertas propiedades con las líneas murinas, como mantener un estado indiferenciado y de auto-renovación por prolongados períodos de cultivo, sus derivados clonales conservan un cariotipo normal,¹⁸ así como la expresión de Oct-3/4 y actividad alta de telomerasa. La prueba de la pluripotencia en CTE de

ratón, como ya se ha mencionado, es la contribución a diversos tejidos al inyectarse en embriones tempranos y la generación de ratones quiméricos; sin embargo, para las CTE humanas estas pruebas no se pueden realizar por razones éticas. De esta forma, el estándar de oro, es la demostración que estas células humanas son capaces de diferenciarse a derivados de las tres capas embrionarias *in vitro* y formar teratomas al ser inyectadas en ratones inmunodeficientes.^{19,20}

En contraste, las CTE humanas crecen más lentamente, tienden a formar colonias esféricas más aplanadas y son más fáciles de disociar en células individuales que las CTE murinas.²¹ Cabe resaltar que LIF es insuficiente para inhibir la diferenciación de las CTE humanas,¹⁹ las cuales deben ser co-cultivadas con FER o fibroblastos provenientes de tejidos humanos. Las señales producidas por los fibroblastos que son esenciales para la auto-renovación en un estado indiferenciado de las CTE humanas están aún por ser identificadas.

DIFERENCIACIÓN DE CTE

El método más empleado para la diferenciación de las CTE en cultivo es formando estructuras esféricas tridimensionales en suspensión, denominadas cuerpos embrionarios (CE) debido a su semejanza con el tejido embrionario post-implantado. Sin embargo, la diferenciación de los CE no asemeja en todo al desarrollo embrionario. La diferenciación de las CTE inicia al cultivarlas como CE en la ausencia de señales de auto-renovación, (capa de células nodriza o LIF). Se ha descrito recientemente que el co-cultivo con líneas celulares provenientes de células estromales, también es capaz de diferenciar a las CTE *in vitro*.²²

Una vez que la diferenciación comienza, las células representativas de las capas germinales primarias empiezan su desarrollo *in vitro*. Inicialmente, una capa externa de células de tipo endodermo se forma en los CE, seguida por el desarrollo de un anillo ectodérmico y el subsiguiente desarrollo de células del mesodermo. La transferencia de estos CE a cajas de cultivo en donde se pueden adherir, permite la diferenciación en una variedad de células especializadas como células del miocardio, del músculo liso y esquelético, hematopoyéticas, pancreáticas, hepáticas, del tejido adiposo, cartilaginosas, neuronales, etc.

Una característica muy importante de las células diferenciadas a partir de CTE es la expresión temporal de genes tejido-específicos, lo cual indica que los procesos tempranos del desarrollo *in vivo* hacia las 3 capas embrionarias son recapitulados *in vitro*.²³ Después de la formación de los CE, éstos son sembrados en condiciones adherentes de cultivo en las cuales las células especiali-

zadas se multiplican y se desarrollan. El tiempo de cultivo de los CE depende del tipo celular que queremos obtener.²⁴ Los precursores de mesodermo y ectodermo se forman en pocos días, mientras que algunos tipos celulares del mesodermo se benefician de períodos de tiempo más prolongados en donde los CE se vuelven quísticos.^{23,25}

La eficiencia de la diferenciación es afectada por diversos parámetros, como la densidad de las CTE, los componentes del medio, factores de crecimiento, proteínas de matriz extracelular, pH, osmolaridad y la calidad del suero fetal bovino. Incluso, la eficiencia de la diferenciación depende del lote del cual provenga el suero.²⁶

Las CTE humanas, se diferencian cuando son removidas mecánicamente o por disociación enzimática de las capa nodriza y cultivadas como CE. Los CE formados bajo estas condiciones son heterogéneos y expresan marcadores de varios tipos celulares, incluyendo los de linajes neuronal, pancreático y cardíaco.^{19,27,28}

Se ha descrito que la activina A y el factor de crecimiento tumoral β (TGF β) inducen principalmente un fenotipo mesodérmico; el ácido retinoico, el factor de crecimiento epidérmico (EGF); las proteínas morfogénicas de hueso (BMP) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), inducen tanto la diferenciación en ectodermo y mesodermo. Por otra parte el factor de crecimiento neuronal (NGF) y el factor de crecimiento hepático (HGF) promueven la diferenciación hacia derivados de las 3 capas germinales. Finalmente, cuando las CTE humanas son inducidas con BMP4, muestran características de células con linaje de trofoblasto.²⁹

TERAPIAS CELULARES

Uno de los problemas más importantes en el campo de los trasplantes es la falta de tejidos y órganos provenientes principalmente de cadáveres, que sean idóneos para ser trasplantados, así como la falta de tratamientos para el reemplazo, reparación o mejoramiento de la función biológica de tejidos dañados por medio de la terapia celular, lo cual ha llevado a una búsqueda intensiva de fuentes alternativas de células. Las células donadoras para este tipo de terapias provienen de tejidos autólogos (del mismo individuo), alogénicos (misma especie) y xenoinjertos (diferente especie).

En estas terapias, se han utilizado líneas celulares inmortalizadas o primarias y células troncales derivadas del adulto como las hematopoyéticas. Una fuente alternativa y prometedora para la generación de células para este tipo de terapias son las CTE, debido a las propiedades que ya se han mencionado en esta revisión, con las cuales se podría generar *in vitro* una cantidad ilimitada de células, además de no tener problemas de compatibilidad.³⁰

POSIBLE USO TERAPÉUTICO DE LAS CTE COMO FUENTE DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS β PANCREÁTICAS

La diabetes representa uno de los objetivos más atractivos tanto para la terapia celular como para la terapia regenerativa utilizando células troncales o sus derivados. Esta enfermedad crónica es caracterizada por una falla en la homeostasis de la glucosa, resultando en una variedad de complicaciones. La diabetes tipo I resulta de la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas residentes en los islotes de Langerhans.³¹ La eliminación de estas células en los pacientes con diabetes tipo I les causa dependencia de por vida de la inyección diaria de insulina, del monitoreo rutinario de sus niveles de glucosa y de un estricto control dietético.

El reemplazo de las células β en estos pacientes podría proporcionarles cura total, siempre que se pueda controlar la reacción inmune que ocasionó la muerte de las células pancreáticas originales. El 90% de los pacientes diabéticos sufren el tipo 2, asociado con resistencia periférica a la insulina y con una inadecuada secreción de la hormona.³² En etapas tardías de la enfermedad el número de células β también disminuye en forma importante,³³ lo cual significa que los pacientes con diabetes tipo 2 podrían también beneficiarse con terapias de reemplazo celular.

Hoy en día, aun con condiciones óptimas de tratamiento, los pacientes diabéticos sufren de complicaciones a largo plazo asociadas con el incorrecto metabolismo de la glucosa como falla renal, retinopatía y neuropatía diabética.³⁴

La formación de las células β pancreáticas involucra la expresión de factores transcripcionales que dirigen a las células precursoras endocrinas a madurar hacia células que producen insulina (*Figura 1A*).

Se ha especulado que las potenciales fuentes celulares para generar células β son: la proliferación de células β diferenciadas,³⁵ la transdiferenciación de células intestinales³⁶ o de hepatocitos a células β ³⁷ y la diferenciación de células troncales neurales^{38,39} y de CTE.

La generación de células endocrinas pancreáticas productoras de insulina a partir de CTE puede ser de suma importancia para el tratamiento de la diabetes. Para este propósito, se han descrito varios protocolos para generar células de islote pancreático a partir de CTE en cultivo. El primero, un protocolo de cinco pasos, es una adaptación del protocolo que se utiliza para la diferenciación hacia linaje neuronal e involucra al FGF y factores que promueven la maduración de células. Con este procedimiento se obtuvieron agregados de células que asemejan a los islotes pancreáticos, que contenían células inmuno-reactivas a insulina, glucagón o somatostatina, y

que eran capaces de secretar insulina en respuesta a una concentración elevada de glucosa. Sin embargo, el contenido de insulina era bajo. Además cuando se probó su función *in vivo* en un modelo de ratón diabético inducido por estreptozotocina, las células trasplantadas no pudieron corregir la hiperglucemia.⁴⁰

Varios grupos han modificado este método y han reportado mejor producción de células β . Algunas modificaciones incluyen la expresión constitutiva del factor de transcripción Pax 4⁴¹ y la expresión de Pdx 1 durante la diferenciación,⁴² ya que Pdx 1 y Pax 4 son esenciales para el desarrollo *in vivo* de las células β pancreáticas.⁴³ De esta forma, Blyszczuk y colaboradores mostraron que la expresión constitutiva del gen Pax 4, que controla el desarrollo pancreático, es esencial para la formación de células que expresan insulina (*Figura 1B*).

Ku y colaboradores modificaron este protocolo cultivando CE en presencia de activina B, exendina-4 y nicotinamida (*Figura 1B*), lo cual desarrolló poblaciones celulares que expresaban el gen de insulina I, para posteriormente aparecer células que expresaban varios marcadores de diferenciación endodérmica. La inmunotinción reveló que las células dentro de los cultivos eran positivas para el péptido C, indicando que la insulina detectada fue producida por estas células. Así mismo, los niveles del RNA mensajero de insulina I y la frecuencia de células que expresaron insulina se incrementó de menos del 1% al 2.7% del total de la población.⁴⁴

Estas células co-expresaban el péptido C presente en la pro-insulina y normalizaron los niveles de glucosa sanguínea después de ser trasplantadas en el ratón diabético inducido por estreptozotocina.⁴¹ Sin embargo, trabajos posteriores postularon que la secreción de insulina por estas células puede ser un artefacto. Los roedores contienen 2 genes de insulina, insulina I e insulina II.⁴⁵ El primero es expresado en células tipo β , mientras que el segundo se encuentra en el cerebro en desarrollo, además del páncreas.^{46,47} Dado que los cultivos de CTE descritos anteriormente contienen un cierto número de neuronas, es posible que algunas de las células positivas a insulina detectadas sean derivadas del linaje neuronal. Además, se ha planteado la posibilidad de que células inmuno-reactivas a insulina no la produzcan, sino la tomen del medio del cultivo.⁴⁸⁻⁵⁰ Estas células derivadas de CTE podrían liberar insulina al medio cuando sufren apoptosis o estrés.^{49,51}

Un segundo método para la generación de estructuras con apariencia de islotes, fue el desarrollar una población heterogénea derivada de CTE, para posteriormente ser inducidas por suero. Este método ha producido un número escaso de células que muestran características de células tipo β como la presencia del péptido C y de gránulos de insulina dentro de la célula.⁵² Para enrique-

cer a las células tipo β de este tipo de cultivos, se ha desarrollado una estrategia de selección basada en la expresión del gen que confiere resistencia a neomicina dirigido por el promotor de insulina. La selección de los cultivos permitió el aislamiento de clones secretores de insulina que contenían la hormona en niveles similares a los encontrados en islotes pancreáticos de animales normales.⁵³ Cuando estas colonias se inyectaron a ratones diabéticos, corrigieron los niveles de glucosa sérica de esos animales hasta por 12 semanas. Sin embargo, más allá de este tiempo un número significativo de animales regresaron a sus niveles hiperglucémicos, indicando que las células son incapaces de proporcionar una recuperación a largo plazo. De manera similar, la selección de li-

naje utilizando CTE que expresan el gen de resistencia a neomicina dirigido por el promotor de $nk \times 61$ pudo ser aprovechado para generar células productoras de insulina (Figura 1C), las cuales normalizaron la glucemia hasta 16 días después de ser trasplantadas en animales diabéticos.⁵⁴

Por otra parte, estudios iniciales con CTE humanas indican que la diferenciación *in vitro* genera el 1% de células secretoras de insulina que muestran características de células endocrinas pancreáticas.⁵⁵ El tratamiento de las CTE humanas con NGF resultó en la sobre-expresión del gen *Pdx 1*, lo que aumentó la transcripción del gen de insulina y la mayor liberación de la hormona.²⁸ Recientemente, se ha descrito otro protocolo para la diferencia-

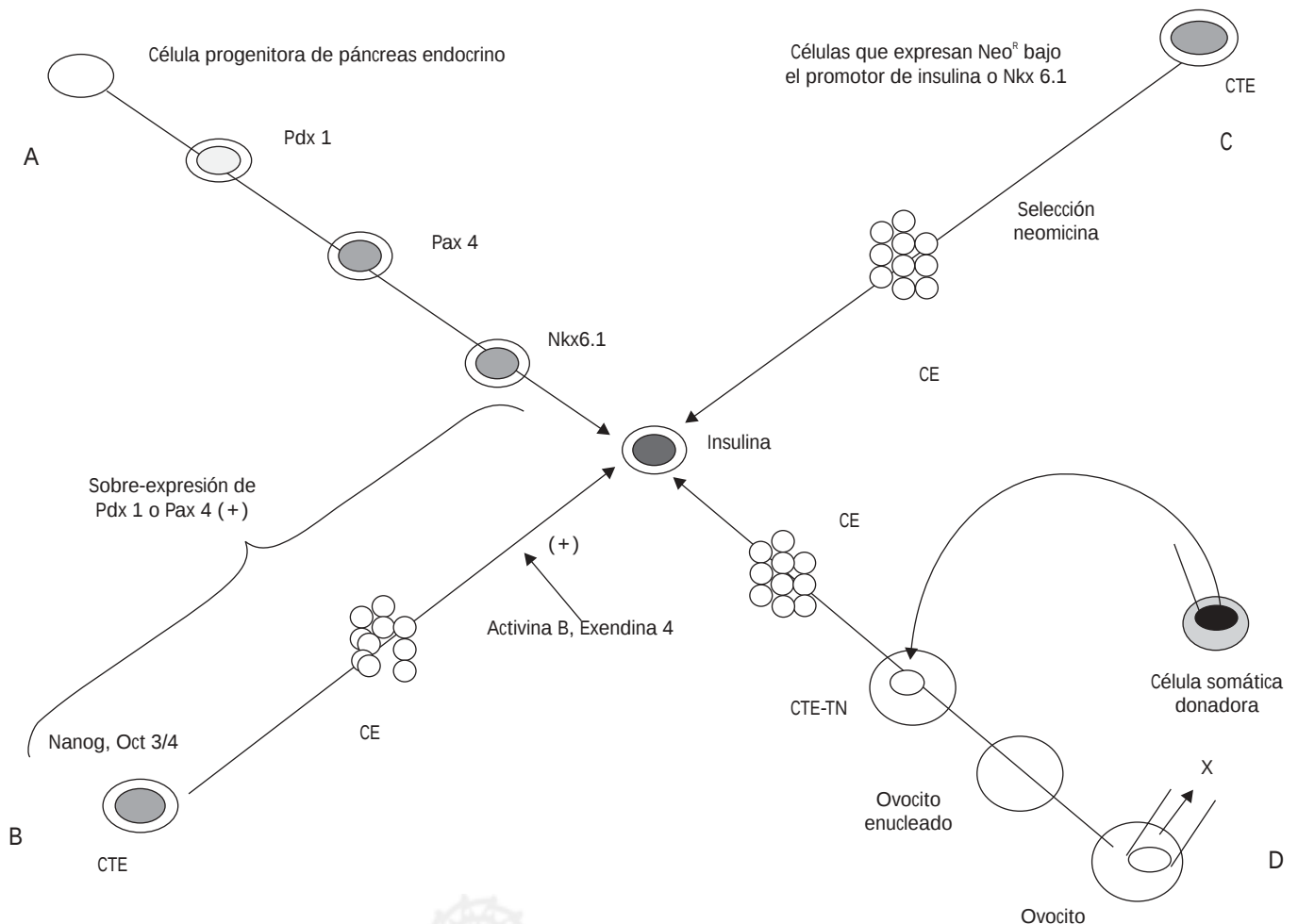


Figura 1. Vías de diferenciación de células productoras de insulina en el páncreas y a partir de células troncales embrionarias (CTE). **A**, en el páncreas endocrino, se ha establecido una expresión sucesiva de los factores transcripcionales que se indican, teniendo como resultado la formación de células β . **B**, células que producen insulina pueden diferenciarse a partir de CTE (células *Nanog* y *Oct 3/4* positivas) mediante la formación de cuerpos embrionarios (CE). Existen moduladores positivos para este proceso como la citocina activina B y endodina 4. La expresión inducida de los factores *Pdx 1* o *Pax 4* eficientizan la diferenciación a células productoras de insulina. **C**, la selección de células mediante el uso de las regiones promotoras de insulina o *Nkx 6.1* permiten un enriquecimiento en la proporción de células que expresan insulina. **D**, esquema hipotético para el uso de CTE humanas generadas mediante trasplante nuclear (CTE-TN) que pueden diferenciarse a células secretoras de insulina. La X indica la eliminación del núcleo del ovócito.

ción de células productoras de insulina a partir de CTE humanas, el cual se basa en el protocolo de cinco pasos descrito anteriormente,⁴⁰ en donde los CE son cultivados en medio libre de suero adicionado con fibronectina, para posteriormente cambiarse a medio N2 adicionado con FGF-2. Al final de esta etapa se retira el FGF-2 se reduce la concentración de glucosa en el medio y se adiciona nicotinamida. Finalmente, las células se disocian y crecen en suspensión, lo cual resulta en la formación de cúmulos con una alta secreción de insulina (además de encontrarse glucagón o somatostatina) lo cual sugiere una similitud con células pancreáticas inmaduras.⁵⁶ Hasta el momento no existen reportes del trasplante de células positivas a insulina diferenciadas de CTE humanas en modelos de diabetes.

PERSPECTIVAS

Aunque los datos mencionados anteriormente, nos dan una idea de la capacidad de las CTE de ratón y humano para diferenciarse en células β pancreáticas, todavía no es claro si la progenie derivada de las CTE humanas podrían tener una función fisiológica a largo plazo en el cuerpo humano. Sin embargo, el potencial de desarrollo *in vitro* y el éxito de las CTE en modelos animales demuestran el potencial uso de células derivadas de CTE humanas como una fuente para terapias de trasplante en el humano. Antes de emprender esta ardua tarea, se deben vencer un número de obstáculos con este tipo de células, como son la derivación eficiente de CTE humanas en ausencia de derivados animales y comprender los cambios genéticos y epigenéticos que ocurren durante los cultivos *in vitro*.

Debemos contar con métodos eficientes para purificar células diferenciadas, ya sea mediante manipulación genética (si las células son modificadas debemos tener extremo cuidado en vigilar los posibles cambios en el cariotipo durante los pasajes y su capacidad para diferenciarse en el fenotipo deseado), o utilizando marcadores de superficie. Así mismo, las células una vez trasplantadas deben de ser funcionales dentro del organismo. Finalmente, debemos asegurarnos de que no haya la formación de tumores derivados de CTE y que exista la inmunocompatibilidad entre donadores y receptores.

Además, para fines terapéuticos, no se recomienda que las CTE humanas crezcan en capas de FER ni que se utilicen medios de cultivo que contengan productos de origen animal, debido al riesgo de transferir patógenos hacia el humano. Por esta razón, las CTE humanas están empezando a ser derivadas en capas nodrizas de células humanas o sin capa nodriza, bajo condiciones libres de productos de origen animal.^{57,58} En el largo plazo, probablemente se pueden realizar trasplantes de células

diferenciadas a partir de CTE clonadas mediante la transferencia nuclear de una célula somática de pacientes, como se ha reportado recientemente.⁵⁹ El donador de la célula somática podría ser el propio paciente o un familiar cercano que sea histocompatible (*Figura 1D*). Este procedimiento no asegura que las células trasplantadas vayan a sobrevivir y continuar funcionando por períodos prolongados, pero sería un gran avance en el sentido que no se dependería de donadores cadavéricos o xeno-injertos.

AGRADECIMIENTOS

Fabián Díaz es becario postdoctoral de la DGAPA, UNAM.

BIBLIOGRAFÍA

1. Solter D, Skreb N, Damjanov I. Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma. *Nature* 1970; 227: 503-504.
2. Stevens LC. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. *Dev Biol* 1970; 21: 364-382.
3. Donovan PJ, Gearhart J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 2001; 414: 92-97.
4. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292: 154-156.
5. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 7634-7638.
6. Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 1984; 309: 255-256.
7. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 435-462.
8. Wobus AM, Holzhausen H, Jakel P, Schoneich J. Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. *Exp Cell Res* 1984; 152: 212-219.
9. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988; 336: 688-690.
10. Williams RL, Hilton DJ, Pease S et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988; 336: 684-687.
11. Aghajanova L. Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1034: 176-183.
12. Boeuf H, Hauss C, Graeve FD, Baran N, Keding C. Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J Cell Biol* 1997; 138: 1207-1217.
13. Solter D, Knowles BB. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 5565-5569.
14. Burdon T, Chambers I, Stracey C, Niwa H, Smith A. Signaling mechanisms regulating self-renewal and differentia-

- tion of pluripotent embryonic stem cells. *Cells Tissues Organs* 1999; 165: 131-143.
15. Prelle K, Vassiliev IM, Vassilieva SG, Wolf E, Wobus AM. Establishment of pluripotent cell lines from vertebrate species present status and future prospects. *Cells Tissues Organs* 1999; 165: 220-236.
 16. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000; 24: 372-376.
 17. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H et al. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003; 113(5): 631-642.
 18. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 2000; 227: 271-278.
 19. Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 399-404.
 20. Richards M, Fong CY, Chan WK, Wong PC, Bongso A. Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2002; 20(9): 933-936.
 21. Laslett AL, Filipczyk AA, Pera MF. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Trends Cardiovasc Med* 2003; 13: 295-301.
 22. Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S et al. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron* 2000; 28: 31-40.
 23. Leahy A, Xiong JW, Kuhnert F, Stuhlmann H. Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool* 1999; 284: 67-81.
 24. Keller GM. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1995; 7: 862-869.
 25. Abe K, Niwa H, Iwase K et al. Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. *Exp Cell Res* 1996; 229: 27-34.
 26. Ying QL, Stavridis M, Griffiths D, Li M, Smith A. Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 183-186.
 27. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D et al. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* 2000; 6: 88-95.
 28. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N. Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11307-11312.
 29. Xu RH, Chen X, Li DS et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 1261-1264.
 30. Gage FH. Cell therapy. *Nature* 1998; 392: 18-24.
 31. Bach JF. Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease. *Endocr Rev* 1994; 15: 516-542.
 32. Taylor SI, Accili D, Imai Y. Insulin resistance or insulin deficiency. Which is the primary cause of NIDDM? *Diabetes* 1994; 43: 735-740.
 33. Maedler K, Donath MY. Beta-cells in type 2 diabetes: a loss of function and mass. *Horm Res* 2004; 62: 67-73.
 34. Nathan DM. Long-term complications of diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 328: 1676-1685.
 35. Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ et al. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1115-1124.
 36. Kawaguchi Y, Cooper B, Gannon M, Ray M, MacDonald RJ, Wright CV. The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat Genet* 2002; 32: 128-134.
 37. Sapir T, Shternhall K, Meivar-Levy I et al. Cell-replacement therapy for diabetes: Generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 7964-7969.
 38. Hori Y, Gu X, Xie X, Kim SK. Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells. *Plos Med* 2005; 2: e103.
 39. Burns CJ, Minger SL, Hall S et al. The *in vitro* differentiation of rat neural stem cells into an insulin-expressing phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 326: 570-577.
 40. 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: 1389-1394.
 41. Blyszczuk P, Czyz J, Kania G et al. Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 998-1003.
 42. Miyazaki S, Yamato E, Miyazaki J. Regulated expression of pdx-1 promotes *in vitro* differentiation of insulin-producing cells from embryonic stem cells. *Diabetes* 2004; 53: 1030-1037.
 43. Murtaugh LC, Melton DA. Genes, signals, and lineages in pancreas development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19: 71-89.
 44. Melloul D, Marshak S, Cerasi E. Regulation of insulin gene transcription. *Diabetologia* 2002; 45: 309-326.
 45. Deltour L, Leduque P, Blume N et al. Differential expression of the two nonallelic proinsulin genes in the developing mouse embryo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 527-531.
 46. Devaskar SU, Singh BS, Carnaghi LR, Rajakumar PA, Giddings SJ. Insulin II gene expression in rat central nervous system. *Regul Pept* 1993; 48: 55-63.
 47. Paek HJ, Morgan JR, Lysaght MJ. Sequestration and synthesis: the source of insulin in cell clusters differentiated from murine embryonic stem cells. *Stem Cells* 2005; 23: 862-867.
 48. Rajagopal J, Anderson WJ, Kume S, Martinez OI, Melton DA. Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake. *Science* 2003; 299: 363.
 49. Sipione S, Eshpeter A, Lyon JG, Korbitt GS, Bleackley RC. Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells. *Diabetologia* 2004; 47: 499-508.

50. Hansson M, Tonning A, Frandsen U et al. Artfactual insulin release from differentiated embryonic stem cells. *Diabetes* 2004; 53: 2603-2609.
51. Kahan BW, Jacobson LM, Hullett DA et al. Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells: an *in vitro* model to study islet differentiation. *Diabetes* 2003; 52: 2016-2024.
52. 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.
53. Leon-Quinto T, Jones J, Skoudy A, Burcin M, Soria B. *In vitro* directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells. *Diabetologia* 2004; 47: 1442-1451.
54. Ku HT, Zhang N, Kubo A et al. Committing embryonic stem cells to early endocrine pancreas *in vitro*. *Stem Cells* 2004; 22: 1205-1217.
55. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001; 50: 1691-1697.
56. Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters. *Stem Cells* 2004; 22: 265-274.
57. Amit M, Margulets V, Segev H et al. Human feeder layers for human embryonic stem cells. *Biol Reprod* 2003; 68: 2150-2156.
58. Hovatta O, Mikkola M, Gertow K et al. A culture system using human foreskin fibroblasts as feeder cells allows production of human embryonic stem cells. *Hum Reprod* 2003; 18: 1404-1409.
59. Hwang WS, Roh SI, Lee BC et al. Patient-specific embryonic stem cells derived from human SCNT blastocysts. *Science* 2005; 308: 1777-1783.