

¿Qué son las células troncales o “células madre”?

What are stem cells or “mother cells”?

Santiago René Anzaldúa Arce* María de Lourdes Juárez Mosqueda* Héctor Villaseñor Gaona*
María Cristina Ríos Mas** Miguel Ángel Cornejo Cortés*** Marco Antonio Meraz Ríos†

Abstract

This paper presents an updated review of the main general aspects of stem cells: historical background; definition of stem cells based on their main characteristics (degree of differentiation, pluripotent potential, self-renewing capacity and reintegration to embryonic tissue); classification of stem cells by their degree of differentiation (totipotent stem cells, pluripotent stem cells, multipotent stem cells, and tissue-specific stem cells); origins of pluripotent stem cells (embryonic carcinoma cells, embryonic stem cells, and embryonic germ cells); main methods to obtain embryonic stem cells (use of morulae, complete blastocysts and immunosurgery of inner cell mass); main methods to obtain adult stem cells (purification in peripheral blood, umbilical cord blood, whole bone marrow, and nervous tissue).

Key words: STEM CELLS, EMBRYONIC STEM CELLS, ADULT STEM CELLS, MORULA, BLASTOCYST, EMBRYOBLAST, TOTIPOTENT, PLURIPOTENT, MULTIPOTENT.

Resumen

En el presente trabajo se realiza una revisión actualizada sobre los principales aspectos generales de las células troncales: antecedentes históricos, definición de las células troncales con base en sus principales características (grado de indiferenciación, pluripotencialidad, capacidad de autorrenovación y reintegración a tejidos embrionarios); clasificación de las células troncales por su grado de diferenciación (células troncales totipotenciales, células troncales pluripotenciales, células troncales multipotenciales y células troncales de tejidos y órganos específicos); origen de las células troncales pluripotenciales (células de carcinoma embrionario, células troncales embrionarias y células germinales embrionarias); principales métodos para obtener células troncales embrionarias (utilización de mórulas, blastocistos completos e inmunocirugía del macizo celular interno); principales métodos para obtener células troncales de tejidos adultos (purificación de sangre periférica, de sangre de cordón umbilical, de médula ósea completa y de tejido nervioso).

Palabras clave: CÉLULAS TRONCALES, CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS, CÉLULAS TRONCALES ADULTAS, MÓRULA, BLASTOCISTO, EMBRIOBLASTO, TOTIPOTENCIAL, PLURIPOTENCIAL, MULTIPOTENCIAL.

Recibido el 25 de mayo de 2006 y aceptado el 17 de octubre de 2006.

*Sección de Histología y Biología Celular, Departamento de Morfología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México D. F.

**Sección de Anatomía, Departamento de Morfología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F.

***Sección de Ciencias Morfológicas Agropecuarias, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Estudios Superiores-Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Carretera Cuautitlán-Teoloyucan, Km 2.5, Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México, 54714, Apartado postal 25.

†Departamento de Biomedicina Molecular, Centro de Investigación y Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. Zacatenco, 07360, México, D.F.

Correspondencia : Santiago René Anzaldúa Arce, Sección de Histología y Biología Celular, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D.F., correo electrónico: rene@fmvz.unam.mx

Introduction

Stem cells are characterized by their undifferentiation, self-renewing capacity and, under certain conditions, which are not well defined, be specialized to perform a specific function.¹ Most of the studies have been conducted in mice, and they indicate that these cells emerge in the early stages of embryonic development. Upon differentiation, stem cells form various cell strains that constitute the different types of embryonic tissue.

Stem cells, also called “mother cells”, are divided into two main groups: embryonic stem cells and adult stem cells (of somatic origin).^{2,3} The main difference between these groups lies in their degree of differentiation or potential to form different cell types. Embryonic stem cells can generate all types of animal tissue cells. According to their degree of differentiation or potential, they give rise to different cell types, and are classified into totipotent, pluripotent, multipotent and tissue-progenitor cells. The first two types are only found in embryos; the last two are found in adult organisms.

The identification of stem cells in various tissues of the adult body and the human embryo's capacity to generate stem cells have raised great interest among scientists, mainly because of the possible therapeutic applications these cells might have. Among these are the production of complete organs to replace affected organs, such as kidneys or heart, thus avoiding donor search; or cell regeneration in tissues, to be used in treatment of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer and Parkinson. Among the applications of stem cells, there is the creation of transgenic animals, including mice, rats, pigs and primates. This constitutes a novel tool to produce animal models with genetic alterations found in human diseases, which allows to examine the equivalent manifestation of signs and symptoms, and to test treatments in order to develop more effective therapies. Stem cells can also be used in veterinary medicine, to implement innovative technologies in the breeding and genetic manipulation of domestic animals.

However, despite the potential of stem cells, there has been huge controversy about their research and use. This has caused great confusion regarding their features and achievements. Those are the reasons which motivated this study. Hoping that the data contained in this paper will prove useful in clarifying the controversy built around this type of cells.

Historical background

Research on stem cells began in the early 70s, when Till and McCulloch,⁴ followed by Becker *et al.*,⁵ observed

Introducción

Las células troncales se caracterizan por ser indiferenciadas, tener capacidad de autorrenovarse y, ante determinadas señales, aún poco conocidas, especializarse para realizar una función concreta.¹ Gran parte de los estudios se han realizado en ratones e indican que en las primeras etapas del desarrollo embrionario surge ese tipo de células, que, al diferenciarse, forman gran número de estirpes celulares que constituyen los tejidos del embrión.

Las células troncales, también llamadas “células madre”, se clasifican en dos grandes grupos: troncales embrionarias y troncales adultas (de origen somático).^{2,3} La diferencia principal entre ambos grupos radica en el grado de indiferenciación o potencialidad que conservan para originar diferentes tipos celulares. Las células troncales embrionarias pueden dar origen a células de todos los tejidos del animal. De acuerdo con su grado de indiferenciación, o potencialidad para originar diferentes células, se clasifican en: totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y progenitoras de tejido. Las dos primeras sólo se encuentran en el embrión, las dos últimas en el organismo adulto.

La identificación de células troncales en diversos tejidos del cuerpo adulto y el hecho de generar células troncales del embrión humano, ha despertado un enorme interés entre los científicos, principalmente por las posibles aplicaciones terapéuticas que aquéllas pueden tener, por ejemplo, producción de órganos completos para sustituir órganos afectados, como riñón y corazón, evitando así la búsqueda de donantes o la regeneración de células en tejidos, para aplicar terapias en enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer y Parkinson, entre otras. Entre las aplicaciones de las células troncales se observa la creación de animales transgénicos, como ratones, ratas, cerdos y primates, pues ellos constituyen una herramienta novedosa para producir modelos animales en donde existen las alteraciones genéticas de enfermedades del hombre, que permiten seguir la manifestación equivalente de signos y síntomas, facilitando el hecho de probar tratamientos para desarrollar terapias más efectivas. Otro aspecto de las células troncales es su utilización en la medicina veterinaria, para implementar tecnologías innovadoras en la crianza y manipulación genética de animales domésticos.

Sin embargo, a pesar del potencial de este tipo de células, se han generado grandes controversias en relación con su investigación y uso, lo que ha ocasionado enorme confusión en cuanto a la información que se tiene sobre ellas y sus logros. Estas razones impulsaron la realización de este trabajo, en espera de que los

that simple bone marrow cells were able to generate all types of hematopoietic cells under *in vivo* conditions. This led to a great number of studies, whose main contributions are summarized in Table 1.

Definition

Stem cells are also known as “mother cells”, progenitor cells, and embryonic stem cells. They can be defined as undifferentiated, pluripotent cells, capable of self-renewing and incorporating into the developing embryo, participating in the formation of all tissues when they are injected into blastocysts. This definition is based on their main features, as described in Table 2.

Classification of stem cells by their degree of differentiation

The most common classification method of stem cells is based on their potential to generate different cell strains, which is related to their degree of differentiation. According to this classification, there are totipotent stem cells, pluripotent stem cells, multipotent stem cells and tissue-specific stem cells.^{36,50}

Totipotent stem cells

These cells are capable of generating all the cells required for a complete embryo; that is, they generate the embryo’s “own tissues”, such as the ectoderm, endoderm and mesoderm (blastodermic layers), and the “extraembryonic tissues”: vitelline sac, allantoids, amnios and corion (extrafoetal membranes). Unfortunately, it has not been demonstrated if totipotent stem cells are self-renewing *in vivo*; on the contrary, it is widely believed that their self-renewing capacity is quite limited. These cells are created when the sperm fertilizes the egg, forming the diploid cell known as zygote (Figure 1), which is totipotent. After the zygote stage, embryos undergo several mitotic divisions until they reach a size similar to that of somatic cells. The first daughter cells resulting from the zygote division are called blastomers and are totipotent cells with identical characteristics; this means that any of these cells can generate a complete individual. When the embryo has formed from eight to sixteen blastomers, and in some cases even more, it is called morula; afterwards, the morula’s totipotent cells begin to specialize, giving rise to the blastocyst, which is a sphere devoid of cells (trophoblast) with a cell mass (embryoblast) located at one end (Figure 1).^{36,51}

datos presentados sirvan para esclarecer el panorama que se ha creado alrededor de este tipo de células.

Antecedentes históricos

El estudio de las células troncales se inició a principios de la década de 1970, cuando Till y McCulloch⁴ y más tarde Becker *et al.*⁵ observaron cómo células simples de la médula ósea podían generar todos los tipos de células hematopoyéticas *in vivo*. Este hecho propició gran cantidad de estudios, cuyas principales aportaciones se resumen en el Cuadro 1.

Definición

Las células troncales también se conocen como “células madre” o células progenitoras (del inglés *stem cells*, tronco) y células troncales embrionarias. Pueden definirse como células indiferenciadas, pluripotenciales, capaces de autorrenovarse y de incorporarse en el embrión en desarrollo, participando en la formación de todos los tejidos, cuando son inyectadas en blastocistos. Esta definición está basada en sus principales características, que se describen en el Cuadro 2.

Clasificación de las células troncales por su grado de diferenciación

La clasificación más común de las células troncales se fundamenta en la potencialidad que tienen para originar células de diferentes estirpes, lo cual está relacionado con el grado de diferenciación de las células troncales. Con base en lo anterior, existen células troncales totipotenciales, células troncales pluripotenciales, células troncales multipotenciales y células troncales de tejidos específicos.^{36,50}

Células troncales totipotenciales

Estas células tienen la capacidad de dar origen a todas las células de un embrión completo; es decir, originan los “tejidos propios” del embrión, como el ectodermo, endodermo y mesodermo (hojas blastodérmicas), y los “tejidos extraembrionarios”: saco vitelino, alantoides, amnios y corion (membranas extrafetales). Desafortunadamente, no se ha demostrado que las células troncales totipotenciales sean autorrenovables *in vivo*; por el contrario, se cree que presentan autorrenovación muy limitada. Estas células tienen su origen cuando el espermatozoide fertiliza al ovocito, formando la célula diploide que se conoce como cigoto (Figura 1), la cual se caracteriza por ser *totipotencial*. Después de la etapa de cigoto, los embriones experimentan varias divisiones mitóticas hasta alcanzar un tamaño similar a la de las células somáticas. Las primeras células hijas

Cuadro 1				
PRINCIPALES APORTACIONES EN EL ESTUDIO DE LAS CÉLULAS TRONCALES				
MAIN CONTRIBUTIONS TO THE STUDY OF STEM CELLS				
<i>Year</i>	<i>Group</i>	<i>Species</i>	<i>Contribution</i>	<i>Reference</i>
1964	Kleinsmith and Pierce	Mouse	Produced pluripotent cells using ascitic conversion of teratocarcinoma.	6
1966	Cole <i>et al.</i>	Rabbit	Demonstrated that embryoblast generates different tissues.	7
1967	Gardner	Mouse	Produced chimeric mice by union of embryoblast and cells from a pre-implanted blastocyst.	8
1975	Mintz and Illmensee	Mouse	Obtained chimeric mice from blastocysts injected with pluripotent teratocarcinoma cells.	9
1978	Solter and Knowles	Mouse	Obtained first marker to identify embryonic stem cells, called SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen).	10
1981	Martin and Evans; Kaufman	Mouse	Developed first cultures of embryonic stem cells using blastocysts.	11, 12
1986	Gossler <i>et al.</i>	Mouse	Began using stem cells to perform transgenesis.	13
	Donova <i>et al.</i>	Mouse	Postulated a similarity between primordial germ cells and embryonic stem cells.	14
1988	Williams <i>et al.</i>		Identified cytosine called leukemia inhibiting factor (LIF), which preserves embryonic stem cells undifferentiated phenotype.	15
1989	Capecchi		Manipulated genes specific of embryonic stem cells by homologous recombination.	16
	Eistetter	Mouse	Established lines of pluripotent embryonic stem cells from morulae.	17
1990	Pease <i>et al.</i>		Using LIF, achieved culture of embryonic stem cells without nursemaid cells.	18
1993	Wood <i>et al.</i>	Mouse	Obtained chimeric animals by aggregation of embryonic stem cells with morula.	19
1994	Bongso <i>et al.</i>	Human	Isolated cells from embryoblast.	20
	Cherny <i>et al.</i>	Bovine	Isolated, cultured and characterized primordial germ cells.	21
1996	Schoonjan <i>et al.</i>	Rabbit	Informed bad chimeric formation upon injecting embryonic stem cells into blastocyst.	22
1997	Shim <i>et al.</i>	Pig	Produced chimeric animals using pluripotent cells isolated from embryos.	23
1998	Thomson <i>et al.</i>	Human	Obtained embryonic stem cells from embryos obtained by <i>in vitro</i> fertilization.	24
	Shamblott <i>et al.</i>	Human	Obtained embryonic stem cells from aborted fetus gonads.	25
1999	Pittenger <i>et al.</i>	Human	Achieved differentiation of mesenchymal cells in bone, cartilaginous, adipose, muscle tissues, and bone marrow stroma.	26
2000	Iwasaki <i>et al.</i>	Bovine	Achieved birth of calves from tetraploid embryos aggregated with embryonic stem cells.	27
	Valliliev <i>et al.</i>	Rat	Developed culture of cells similar to embryonic stem cells.	28
2002	Saito <i>et al.</i>	Equine	Achieved isolation and differentiation of cells similar to embryonic stem cells.	29
2003	Hübner <i>et al.</i>	Mouse	Developed ovarian follicles, or similar structures, from embryonic stem cells.	30
	Cheong <i>et al.</i>	Human	Achieved embryonic stem cell propagation using bone marrow cells as nursemaid cells.	31
	Ruhnke <i>et al.</i>	Rat	Achieved differentiation in embryonic stem cells obtained from blastocysts, neuronal, endothelial and hepatic lineages.	32
2004	Horiuchi <i>et al.</i>	Chicken	Cloned LIF gene in bacteria and used the expressed product to culture embryonic stem cells.	33
	Park <i>et al.</i>	Human	Generated dopaminergic neurons from embryonic stem cells supplemented with several compounds.	34

Cuadro 2

DESCRIPCIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS QUE DEFINEN A LAS CÉLULAS TRONCALES
DESCRIPTION OF CHARACTERISTICS DEFINING STEM CELLS

Characteristic	Description
Self-regeneration	Cells capable of proliferating and producing identical cells, renewing themselves. ^{35,36}
Undifferentiated state	Cells which have not specialized, comparable to cells found in early embryos. ³⁵⁻³⁸
Pluripotent Potential	Under specific conditions, they can differentiate to generate compromised cells in certain development routes and later become specialized cells. ³⁵⁻³⁷
Integration to developing embryo	They form chimeric animals upon integrating to the embryo at morula or blastocyst stage; animals will have cells from two different genetic backgrounds in their tissues. ^{37,39}
Formation of teratomas	They produce benign tumors (teratomas) when injected subcutaneously or intraperitoneally into immunosuppressed mice. ³⁹
<i>In vitro</i> undifferentiated proliferation	Under certain requirements, they divide and grow in cell cultures, remaining stable and undifferentiated. ^{11,16,18,25,33,40-48}
<i>In vitro</i> differentiation	Removal of certain cytosines from culture environment leads them to constitute the so called embryoid bodies (spherical structures similar to post-implantation embryos). ^{36,37,49}

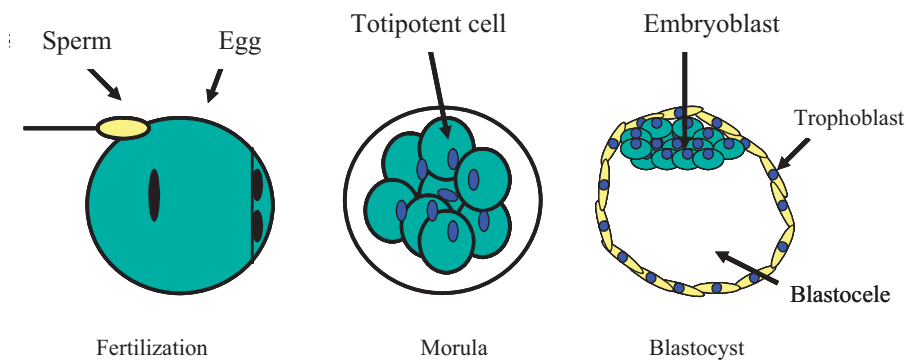


Figura 1: Primeras etapas del desarrollo embrionario. Células que participan en la fecundación y estructuras que conforman la mórula y blastocisto.

Figure 1: First stages of embryonic development. Cells participating in fertilization and structures constituting the morula and blastocyst.

Pluripotent stem cells

Pluripotent cells are derived from the blastocyst's embryoblast, also called inner cell mass (Figure 2). The embryoblast's pluripotent cells are capable of forming all the cells in the embryonic tissues, that is, any type of cells found in an individual (Figure 2), but they are not capable of generating an entire individual since they cannot differentiate into extraembryonic cells, such as the cells found in the placenta (trophoblast) and other support tissues, which are indispensable for intrauterine foetus development. Pluripotent stem cells not only generate all cell types in animal tissue, but they also differentiate *in vitro* into endoderm, ectoderm and mesoderm cells. Besides, when these cells grow in a liquid environment (*in vitro*) and undergo a process of differentiation, they form three-dimensional aggregates called embryoid bodies, which are three-dimensional structures very similar to embryos at the first stages of their development.

que resultan de la división del cigoto se denominan blastómeras y son células totipotenciales con características idénticas; esto último significa que cualquiera de estas células puede dar origen a un individuo completo. Cuando el embrión ha formado de ocho a 16 blastómeras, y en algunos casos más, se denomina mórula; después de ello, las células totipotenciales de la mórula comienzan a especializarse dando origen al blastocisto, que es una esfera hueca de células (troblasto) con una masa celular (embrioblasto) localizada en un extremo (Figura 1).^{36,51}

Células troncales pluripotenciales

Las células pluripotenciales se derivan del embrioblasto, también llamado masa o macizo celular interno del blastocisto (Figura 2). Las células pluripotenciales del embrioblasto son capaces de formar todas las células de los tejidos embrionarios; es decir, cualquier tipo de células que se encuentran en un individuo (Figura

Moreover, when injected into an immunodepressed animal, they are capable of forming teratomas, which are tumors containing a mixture of various types of differentiated or partially differentiated cells.^{36,50,52}

Multipotent stem cells

They are self-renewing cells that are more differentiated than the previously mentioned cells (Figure 2). They are at the top of the cell hierarchy and proliferate *in vivo* to produce differentiated cells which will form a certain tissue. It is important to note that, once developed, these cells renew themselves during all the individual's life, unlike totipotent and pluripotent stem cells, which can only be found in the embryonic stage.

In adult organisms, under *in vivo* conditions, multipotent stem cells can divide repeatedly to repopulate a tissue, as the multipotent hematopoietic stem cells found in bone marrow, which generate all the cells in the hematopoietic system (erythrocytes, leukocytes and platelets), or they can show low activity rates, as in the case of human mesenchymal stem cells, which have differentiated into connective lineages including fibroblasts, osteoblasts, chondrocytes and adipocytes *in vitro* studies.³⁶

Tissue-specific stem cells

These cells suffer a restriction in the expression pattern of their genome; if compared with pluripotent stem cells, they have a higher degree of differentiation and produce cell types characteristic of the tissue in which they are found *in vivo* (Figure 2). These cells are often called "progenitor cells", according to the organ

2), aunque no son capaces de originar un individuo entero porque no pueden diferenciarse en células extraembrionarias, como las de la placenta (trofoblasto) y otros tejidos de sostén, necesarios para el desarrollo del feto dentro del útero. Las células troncales pluripotenciales no sólo dan origen a todos los tipos de células de los tejidos de un animal, también se diferencian *in vitro* en células del endodermo, ectodermo y mesodermo. Asimismo, cuando estas células crecen en un medio líquido (*in vitro*) y sufren diferenciación, forman agregados tridimensionales llamados cuerpos *embrioides*, que corresponden a estructuras tridimensionales muy semejantes a los embriones en primeros estadios de desarrollo. Además, si son inyectadas en un animal inmunodeprimido, son capaces de formar teratomas, que son tumores que contienen una mezcla de varios tipos de células diferenciadas o parcialmente diferenciadas.^{36,50,52}

Células troncales multipotenciales

Son células autorrenovables más diferenciadas que las anteriores (Figura 2), 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 individuo, a diferencia de las células troncales totipotenciales y pluripotenciales, que sólo se encuentran durante la etapa embrionaria.

En los organismos adultos, *in vivo*, las células troncales multipotenciales pueden dividirse repetidamente para repoblar un tejido, como las células troncales hematopoyéticas multipotenciales de la médula ósea, que dan origen a todas las células del sistema

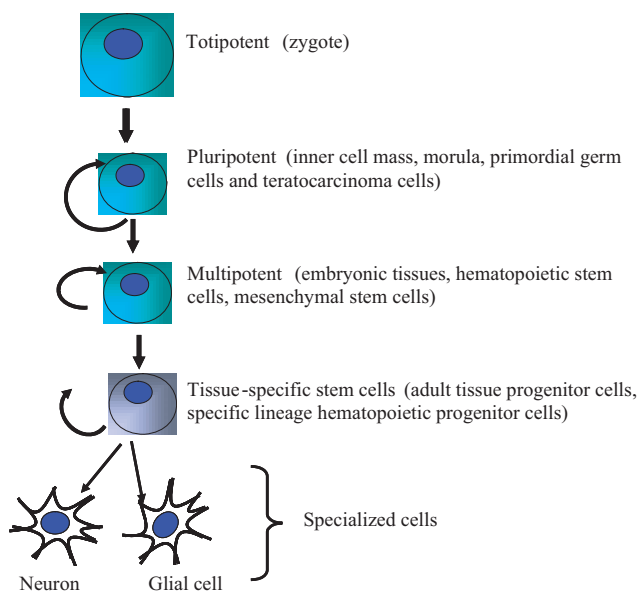


Figura 2: Clasificación de las células troncales por su grado de diferenciación. Tipos de células troncales de acuerdo con el grado de indiferenciación que presentan. Entre paréntesis se encuentran ejemplos de células que corresponden a los diferentes grados de diferenciación (imagen modificada de la referencia 50).

Figure 2: Classification of stem cells by their degree of differentiation. Types of stem cells according to their degree of differentiation. Between parentheses, there are examples of cells corresponding to the different degrees of differentiation (image modified from reference 50).

or tissue generated by them, or the organ or tissue in which they are found *in vivo*; for instance, specific lineage hematopoietic progenitor cells (erythrocytes, lymphocytes, monocytes, etc.), nervous progenitor cells, cornea progenitor cells, and undifferentiated intestinal columnar cells.^{36,53,54}

Classification of pluripotent stem cells by their origin

According to their method of obtention, stem cells are classified into three types:

a) *Embryonic carcinoma cells*. They were the first stem cells to be obtained. They are isolated by an “indirect route”, in which tumoral masses (teratocarcinomas) derived from an embryo are collected (Figure 3). These masses are then disaggregated and injected into an animal’s abdominal cavity to perform an “ascitic conversion”. Certain cellular aggregates called “embryoid bodies” are obtained from this process; these are disaggregated with trypsin and their cells are injected into a histocompatible mouse; finally, pluripotent cells called embryonic carcinoma cells (EC) are obtained from this process.⁵⁵

b) *Embryonic stem cells*. They were studied for the first time during the 80s. In this case, there was a “second route”, in which *in vitro* techniques allowed to isolate directly stem cells from normal embryos, without the need to pass through a tumor state (Figure 3). These cells have been called primitive embryonic cells or embryonic stem cells (ES cells), in order to distinguish between them and embryonic carcinoma cells. Pluripotent cells can be obtained from normal embryos which have not yet been implanted into the uterus, such as disassociated morulae or intact blastocysts. Embryonic stem cells are the most widely used stem cells, as their capacity to form chimeric animals is enormous.^{56,57}

hematopoyético (eritrocitos, leucocitos y plaquetas), o pueden presentar poca actividad, como en el caso de las células troncales mesenquimatosas humanas, que en ensayos *in vitro*, se han diferenciado en linajes conectivos que incluyen fibroblastos, osteoblastos, condrocitos y adipocitos.³⁶

Células troncales específicas de tejido

Estas células sufren una restricción en la expresión de su genoma; en comparación con las pluripotenciales, tienen mayor grado de diferenciación y producen tipos celulares característicos del tejido en el cual se observan *in vivo* (Figura 2). Es común nombrar progenitoras 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 progenitoras hematopoyéticas de linajes específicos (eritrocitos, linfocitos, monocitos, etc.), células progenitoras nerviosas, células progenitoras de la córnea y células columnares indiferenciadas del intestino.^{36,53,54}

Clasificación de las células troncales pluripotenciales por su origen

Por su fuente de obtención, las células troncales se clasifican en tres tipos:

a) *Células de carcinoma embrionario*. Fueron las primeras que se obtuvieron, su aislamiento se realiza por una “ruta indirecta”, en la cual se recolectan masas tumorales (teratocarcinomas) derivadas de un embrión (Figura 3), que son disgregadas e inyectadas en la cavidad abdominal de un animal para realizar una “conversión ascítica”, a partir de ésta se obtienen agregados celulares llamados “cuerpos embrioides”; éstos son disgregados con tripsina y sus células se inyectan en un ratón histocompatible; finalmente, a partir

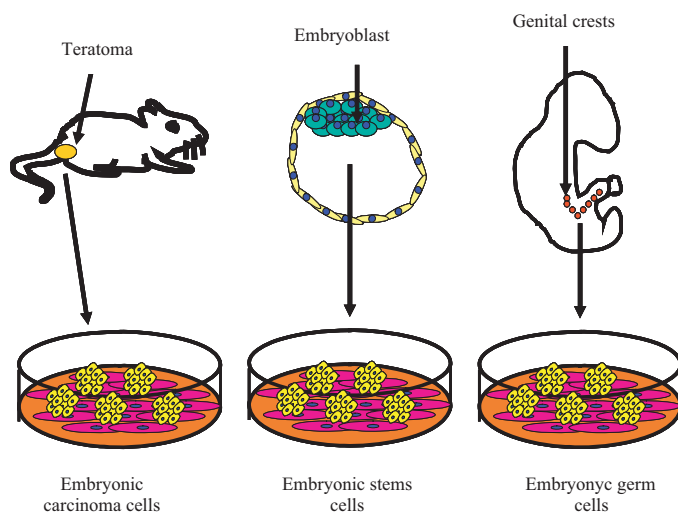


Figura 3: Origen de las células troncales pluripotenciales. Tres clases de células troncales por su origen. Esta clasificación se basa en las tres rutas utilizadas para obtener las diferentes células pluripotenciales.

Figure 3: Origin of pluripotent stem cells. Three types of stem cells according to their origin. This classification method is based on the three routes used to obtain the different pluripotent cells.

EC and ES cells are similar in terms of cellular morphology, expression of cell surface antigens and differentiation behavior *in vitro* and *in vivo*. However, EC lines have shown important experimental limitations, since they cover a very diverse population of culture cell lines (perhaps as a result of their tumoral origin). This heterogeneity between lines is reflected unfavorably in their culture differentiation capacity and in the chimeric association with an infected embryo.^{36,52,56,58}

c) *Embryonic germ cells*. These cells are obtained by reprogramming primordial germ cells (PGC), to transform them into embryonic germ cells (EG), which are pluripotent and are precursors of mature gametes. EG cells are derived from “genital crests” in embryos with a more advanced development (Figure 3); EG cells colonize less effectively the tissues of chimeric animals, as compared to embryonic stem cells.^{25,56}

In vitro characteristics of embryonic stem cells

During the growth of embryonic stem cells, several tests are conducted to know if they are indeed “undifferentiated”. This process is called “characterization”.³⁷ The most widely used tests in laboratories where embryonic stem cells are cultured are:

1) *Growth and subculture*. This test consists in performing several “propagation passes” to verify if cells still retain the morphological characteristics of undifferentiated embryonic stem colonies (Figure 1); that is, that they continue developing colonies of spherical, compact cells over the nursemaid cells.⁵⁹ At the beginning, it was deemed indispensable to culture embryonic stem cells together with nursemaid cells, in order to avoid differentiation in stem cells; later, it was discovered that, in most cases, stem cells require a factor produced by nursemaid cells, which without it they differentiate. This factor is a cytosine called LIF and its expression is stimulated by stem cells. Since then, stem cells can be cultured without nursemaid cells, by adding LIF or related cytosines, such as bFGF, SF y SCF. In some species, it has been possible to obtain lines of stem cells which can remain undifferentiated without LIF.⁴⁸

2) *Molecular markers*. There are several molecular markers to identify stem cells (Table 3). Some of the most important are:

a) *Surface markers*. They are specialized proteins or sugars located at the level of the cytoplasmatic membrane. Among these surface molecules, the one most used for detection is SSEA-1, o CD 15, FAL or trisaccharide 3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine.^{58,60}

b) *Transcription factors*. They are proteins that join the DNA and contribute to “switching on and off” specific genes. Among these is protein Oct-4 (trans-

de éste se obtienen células pluripotenciales denominadas células de carcinoma embrionario (EC).⁵⁵

b) *Células troncales embrionarias*. Éstas se establecieron en la década de 1980. Aquí se marcó una segunda ruta, en la que las técnicas de cultivo *in vitro* permiten el aislamiento de células troncales directamente de embriones normales, sin necesidad de pasar a través de un estado de tumor (Figura 3). Estas células se han denominado células embrionarias primitivas (ES cells) o células troncales embrionarias, con el fin de distinguirlas de las células provenientes de carcinoma embrionario. Las células pluripotenciales pueden obtenerse a partir de embriones normales que aún no se han implantado en el útero como mórulas disociadas o blastocistos intactos. Las células troncales embrionarias son las más utilizadas, pues su capacidad para formar animales quiméricos es enorme.^{56,57}

Las células EC y las ES son similares en términos de morfología celular, expresión de antígenos de superficie celular y comportamiento de diferenciación *in vitro* e *in vivo*, sin embargo, las líneas EC han tenido importantes limitaciones experimentales, pues comprenden una población muy diversa de líneas celulares de cultivo (quizá por su origen tumoral). Esta característica heterogénea entre líneas se refleja desfavorablemente en su capacidad de diferenciación en cultivo y en la asociación quimérica con un embrión portador.^{36,52,56,58}

c) *Células germinales embrionarias*. Estas células se obtienen basándose en la reprogramación de las células germinales primordiales (PGC), para programarlas como células germinales embrionarias (EG), que se caracterizan por ser pluripotenciales y ser precursoras de los gametos maduros. Las células EG se derivan de las “crestas genitales” en embriones con un desarrollo más avanzado (Figura 3); las células EG colonizan de manera menos efectiva los tejidos de un animal quimérico, en comparación con las células troncales embrionarias.^{25,56}

Características in vitro de las células troncales embrionarias

Durante el crecimiento de las células troncales embrionarias se realizan diferentes pruebas para conocer si efectivamente son células troncales embrionarias “indiferenciadas”, este proceso se denomina “caracterización”.³⁷ Las pruebas más utilizadas en los laboratorios donde se cultivan líneas de células troncales embrionarias son:

1) *Crecimiento y subcultivo*. Consiste en la realización de varios “pases de propagación” para verificar que las células sigan manteniendo las características morfológicas de colonias troncales embrionarias indiferenciadas (Figura 1); es decir, que continúen

cription factor belonging to the POU family, which is expressed in totipotent and pluripotent cell lines, in early embryonic cells and in some germ cells lines.⁶¹

3) *Cytoplasmatic enzymes*. A routine test consists in detecting the presence of the alkaline fosfatase enzyme, which is expressed in great amounts in embryonic stem cells remaining in an undifferentiated state.⁶²

4) *Karyotype tests*. These tests serve to determine if cromosomes are normal and stable. This method allows to observe if cromosomes are damaged or if the number of cromosomes has changed. However, this method cannot detect slight genetic mutations; that is, mutations at the level of DNA sequence.⁶³

5) *Differentiation*. Tests are carried out to obtain cell strains from the three germ layers: ectoderm, endoderm and mesoderm. These tests show the cells' "pluripotent potential".⁶⁴

6) *Formation of embryoid bodies*. Stem cells are cultured in a liquid environment, without nursemaid cells and without factors keeping them undifferentiated, so that they form cellular aggregates called "embryoid bodies". These structures have multidifferentiated cells that follow routes similar to those of the embryo, but without the axial organization and the elaboration of a corporal development plan.⁴⁹ Furthermore, if retinoic acid is added, cell aggregates can give rise to certain type of cells, although they will invariably generate a heterogeneous cell mixture.

desarrollando colonias de células esféricas y compactas por encima de las células nodrizas.⁵⁹ En un principio se pensaba que era indispensable hacer crecer las células troncales embrionarias junto con células nodrizas, para evitar que las primeras se diferenciaban; posteriormente se descubrió que, en su mayoría, las células troncales requieren de un factor producido por las células nodrizas, sin el cual se diferencian; este factor es una citocina llamada LIF y su expresión es estimulada por las células troncales. Desde entonces las células troncales pueden cultivarse en ausencia de células nodrizas, agregando LIF o citocinas relacionadas como bFGF, SF y SCF; en algunas especies se han obtenido líneas de células troncales que pueden mantenerse indiferenciadas sin necesidad de LIF.⁴⁸

2) *Marcadores moleculares*. Existen diversos marcadores moleculares para identificar a las células troncales (Cuadro 3), entre los más importantes se encuentran:

a) *Marcadores de superficie*. Son proteínas especializadas o azúcares localizados en el nivel de la membrana citoplasmática. Dentro de estas moléculas de superficie, la más utilizada para detección es la SSEA-1, o CD 15, FAL o trisaccharide 3-fucosyl-N-acetyl-lactosamine.^{58,60}

b) *Factores de transcripción*. Son proteínas que se unen al ADN y ayudan en el "encendido y apagado" de genes específicos, entre éstos la proteína Oct-4 (factor de transcripción de la familia POU), que se expresa en líneas celulares totipotenciales y pluripotenciales, en células embrionarias tempranas y en algunas líneas de células germinales.⁶¹

Cuadro 3
MARCADORES PARA CÉLULAS TRONCALES⁶⁸
MARKERS FOR STEM CELLS⁶⁸

Marker	Main Characteristics
CD133	Surface protein in nervous stem cells which generate glial cells and neurons
CD34	Surface protein in HSC
c-kit	Surface receptor in bone marrow cells
CD30	Surface receptor in pluripotent stem cells
Genesis	Transcription factor expressed by embryonic stem cells during undifferentiated state
GCNF	Transcription factor expressed by pluripotent stem cells
Oct-4	Transcription factor essential for establishing and maintaining totipotent and pluripotent stem cells
SSEA-1	Glycoprotein expressed by pluripotent stem cells in early embryonic development
Sca-1	Surface protein in bone marrow cells, either HSC or MSC
SCF	Membrane protein which increases ES, HSC and MSC proliferation.

In vivo characteristics of embryonic stem cells

1) *Formation of chimeric animals.* One of the most important features of stem cells *in vivo* is their capacity to reintegrate to “embryogenesis”, contributing to the formation of all tissues (including gametes). Thus, they give rise to the so called “chimeric animals”, which can be produced in two ways: a) Injecting embryonic stem cells inside a blastocyst, which is then introduced into a female specimen acting as recipient to finish development (Figure 4),⁶⁵⁻⁶⁷ b) Coculturing two embryos (in morula state) with a group of embryonic stem cells; embryos must then develop with adhered embryonic stem cells until they reach the blastocyst state; then, the blastocyst is introduced into a recipient female to finish development.^{6,19}

During tissue and organ formation in embryos (embryogenesis), stem cells can colonize virtually all embryonic cell types, including vitelline sac mesoderm, allantoids, amnios and gonades, but they do not contribute to form the trophoblast.⁶⁹ These “colonization” routes have been noted by means of transgenic markers, such as galactosidase and green fluorescent protein (GFP).⁷⁰ This tissue-colonization feature during the embryonic stage has made stem cells a fundamental tool in cellular physiology research, since it allows to study the functions of cell proteins, the regulation of genes in tissues, and the development of animal models for specific diseases.

2) *Formation of teratomas.* Stem cells are injected subcutaneously or intraperitoneally into an immunosuppressed mouse, and they cause the formation of a benign tumor, called “teratoma”. Typical teratomas contain a mixture of various types of differentiated

3) *Enzimas citoplasmáticas.* Una prueba de rutina consiste en detectar la presencia de la enzima fosfatasa alcalina, que se expresa en grandes cantidades en las células troncales embrionarias que permanecen en un estado indiferenciado.⁶²

4) *Pruebas de cariotipo.* Mediante esta prueba se determina si los cromosomas son normales y estables. Este método 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.⁶³

5) *Diferenciación.* Se realizan ensayos para obtener estirpes celulares que provengan de las tres hojas germinales: ectodermo, endodermo y mesodermo. Estos ensayos muestran la “pluripotencialidad”.⁶⁴

6) *Formación de cuerpos embrioides.* Las células troncales se cultivan en medio de cultivo líquido, en ausencia de células nodrizas y sin factores que las mantengan indiferenciadas, con la finalidad de que formen agregados celulares denominados “cuerpos embrioides”. Estas estructuras tienen células multidiferenciadas que siguen rutas similares a las del embrión, pero sin la organización axial ni la elaboración de un plan de desarrollo corporal.⁴⁹ Asimismo, si se les adiciona ácido retinoico, los agregados celulares pueden propiciar cierto tipo de células, aunque invariablemente darán origen a una mezcla heterogénea de células.

Características in vivo de las células troncales embrionarias

1) *Formación de animales quiméricos.* Una de las características más importantes de las células troncales *in vivo* es la capacidad de reintegrarse a la “embriogénesis”, contribuyendo así en la formación de todos los

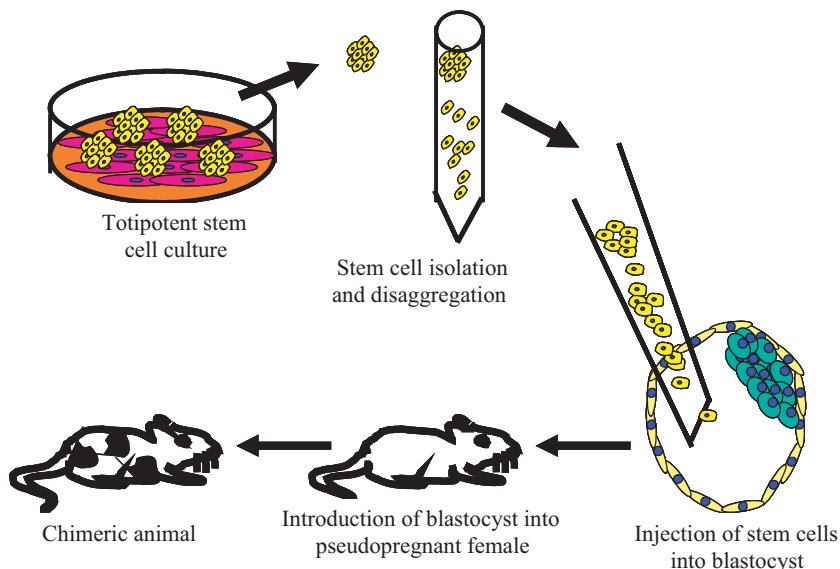


Figura 4: Las células troncales se inyectan en un blastocisto y se transfieren a una hembra pseudogestante para completar su desarrollo.

Figure 4: Stem cells are injected into a blastocyst and transferred to a pseudopregnant recipient female to finish development.

or partially differentiated cells; thus, it is possible to obtain lines of differentiated cells which have derived from stem cells. This procedure is not widely used due to the appearance of protocols with growth factors used *in vitro* to differentiate stem cells.⁷¹

Main methods to obtain embryonic stem cells

Nowadays, embryonic stem cells can be obtained from morulae, complete blastocysts and immunosurgery in inner cell mass.

Morula

Embryos in morula state are obtained by uterine lavage with Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), or by some method of culture with 10% or 15% of added bovine foetal serum. The pellucid zone is removed from morulae and their blastomers are separated using a pipette. When blastomers are obtained, they are cultured on nursemaid cells secreting LIF. After five or six days, round and compact colonies appear, which are isolated and disaggregated with trypsin; they are then sown on new nursemaid cells; thus, every three or four days colonies are checked and subcultures are performed.¹⁷

Complete blastocyst

Blastocysts are obtained by uterine lavage with Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS), or by some method of culture with 10% or 15% of added bovine foetal serum. Intact blastocysts are then cultured on nursemaid cells secreting LIF (Figure 5). After four or five days, blastocysts adhere and embryo-blast cells grow, forming round and compact colonies. These are isolated and disaggregated with trypsin; they are then sown on new nursemaid cells. After four or five days, round and compact colonies are checked again and subcultures are performed (Figure 5).^{21, 57}

Immunosurgery in inner cell mass

The technique of immunosurgery is used to obtain only embryoblast cells. This technique consists in the immediate destruction of trophoblast cells, by adding an antibody to them; the embryoblast can thus be easily separated from the remnants of trophoblastic cells. Cells are then placed on nursemaid cells. From nine to fifteen days later, spheric and compact colonies are formed, which can be isolated and disassociated to perform subcultures.⁷²

tejidos (incluyendo los gametos); de esta forma dan como resultado los llamados "animales quiméricos", que pueden producirse de dos maneras: a) Inyectando células troncales embrionarias dentro de un blastocisto, que se introduce en una hembra que actúa como recipiente para completar su desarrollo; (Figura 4),⁶⁵⁻⁶⁷ b) cocultivando dos embriones (en estado de mórula) más un grupo de células troncales embrionarias, después se dejan desarrollar los embriones con las células troncales embrionarias adheridas hasta alcanzar el estado de blastocisto, y luego se introduce en una hembra recipiente para completar su desarrollo.^{6,19}

Durante la formación de los tejidos y órganos en el embrión (embriogénesis), las células troncales pueden colonizar prácticamente todos los tipos celulares del embrión, como el mesodermo del saco vitelino, el alantoides, el amnios y las gónadas, pero no contribuyen a formar parte del trofoblasto.⁶⁹ Estas rutas de "colonización" han sido observadas con la ayuda de marcadores transgénicos, como la galactosidasa o la proteína fluorescente verde (GFP).⁷⁰ Esta propiedad de colonizar los tejidos durante la etapa embrionaria ha permitido que las células troncales se utilicen como herramienta fundamental para el estudio de la fisiología celular al permitir la investigación de las funciones que tienen las proteínas celulares, la regulación de los genes en los tejidos y el desarrollo de modelos animales para enfermedades específicas.

2) *Formación de teratomas.* Las células troncales se inyectan vía subcutánea o en forma intraperitoneal en un ratón inmunosuprimido y provocan la formación de un tumor benigno llamado "teratoma". Los teratomas típicos contienen una mezcla de varios tipos de células diferenciadas o parcialmente diferenciadas, así se obtienen líneas de células diferenciadas que han derivado de células troncales. Este procedimiento se utiliza poco, debido a la aparición de protocolos con factores de crecimiento que se utilizan *in vitro* para diferenciar células troncales.⁷¹

Principales métodos para obtener células troncales embrionarias

Actualmente, las células troncales embrionarias se pueden obtener a partir de mórulas, blastocistos completos y por inmunocirugía del macizo celular interno.

Mórula

Los embriones en estado de mórula se obtienen mediante lavados del útero con amortiguador de fosfato salino de Dubelcco (DPBS), ó con algún medio de cultivo adicionado con 10% o 15% de suero fetal

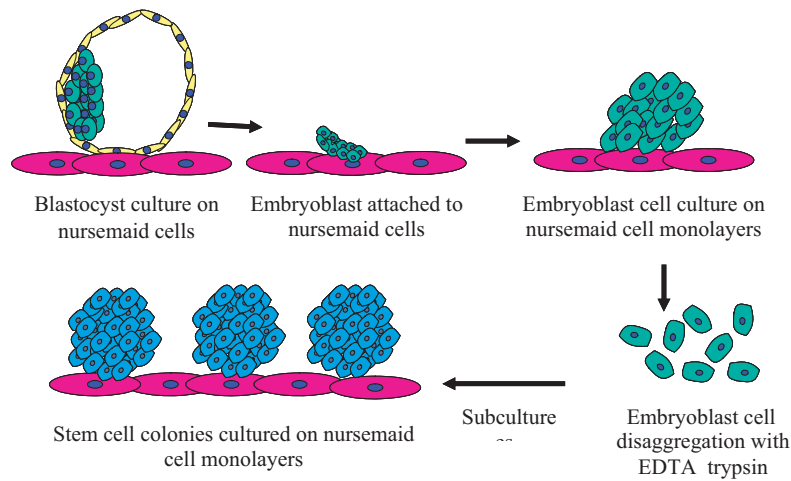


Figura 5: Establecimiento de un cultivo de células troncales. Etapas de un cultivo de células troncales embrionarias utilizando blastocistos completos que son sembrados sobre células nodrizas (fibroblastos embrionarios).

Figure 5: Establishment of a stem cell culture. Stages of an embryonic stem cell culture using complete blastocysts placed on nursemaid cells (embryonic fibroblasts).

Adult stem cells (AST)

It is important to point out that stem cells are not exclusively found in developing embryos, but they are also present in adult tissues, where they play an important role in the organism's homeostasis. Although it is true that cellular diversification normally ends shortly after birth, organs may possess a mechanism to replace cells when they die, either by weakening, apoptosis or damage.^{73,74}

It should also be considered that various adult tissues are regenerated throughout the individual's life span by populations of stem cells, but these cells are specific of a particular lineage. Their only property is that they can divide symmetrically or asymmetrically to produce an identical stem cell and a partially compromised progenitor cell; the latter, even if it is not completely differentiated, will have a limited development capacity. That is why AST are considered as tissue-specific, capable of generating only progenitor cells corresponding to their source tissue.⁷⁵

Stem cells that regenerate and repair adult tissues must be strong, capable of resisting stress of events associated with damage, such as surgical procedures, physical damage, exposition to toxic substances, or damage due to extreme cold or heat. As a matter of fact, experimental evidence suggests that stem cells residing in adult tissues are extremely adaptable to temperature and pH variations, as well as to exposition to toxic substances. This indicates that their requirements for survival might be minimal, and that the difficulty encountered to isolate and successfully propagate purified stem cells might be related, in many culturing methods, to the presence of factors contributing to their differentiation and subsequent senescence.⁷⁶

Studies where cells in mitosis are marked with bromodeoxyuridine or other DNA precursors, not only have allowed to establish the presence of stem cells

bovino. La zona pelúcida se retira de las mórulas y sus blastómeras se separan realizando un pipeteo. Cuando se obtienen las blastómeras, se cultivan sobre células nodrizas que secreten LIF. Después de cinco o seis días aparecen colonias redondas compactas, que son aisladas y se disgregan con tripsina, para luego sembrarlas sobre células nodrizas nuevas; así, cada tres o cuatro días se buscan las colonias y se realizan subcultivos.¹⁷

Blastocisto completo

Los blastocistos se obtienen haciendo lavados del útero con DPBS o con algún medio de cultivo adicionado con 10% ó 15% de suero fetal bovino. Después, los blastocistos intactos se cultivan sobre células nodrizas que secreten LIF (Figura 5); a los cuatro o cinco días, los blastocistos se adhieren y las células del embrioblasto crecen formando colonias redondas y compactas, éstas son aisladas y disgregadas con tripsina y luego se siembran sobre células nodrizas nuevas; después de tres o cuatro días, nuevamente se buscan las colonias redondas compactas y de esta manera se realizan subcultivos (Figura 5)^{21, 57}

Inmunocirugía del macizo celular interno

Para obtener sólo las células del embrioblasto se utiliza la técnica de "inmunocirugía", que consiste en la destrucción mediada por el complemento de las células del trofoblasto, mediante un anticuerpo que se une a dichas células; así, el embrioblasto puede ser separado fácilmente de los remanentes de las células trofoblásticas, después se colocan las células sobre células nodrizas. De nueve a 15 días después, se forman colonias esféricas y compactas que pueden ser aisladas y disociadas para la realización de subcultivos.⁷²

in various body tissues, but have also provided information on their location, the phenotypes of their differentiated progeny and their cycle rates. Such studies have shown a tremendous heterogeneity in the kinetics of stem cells production and in the process of differentiation among tissues.⁷³

AST cells can be divided into two groups: *a*) cells that will generate only tissue- or organ-specific cells (tissue-progenitor cells) and *b*) cells that are capable of generating different cell types (multipotent stem cells).

Adult stem cells can be found in many specialized body tissues, including the brain, bone marrow, liver, skin, gastrointestinal tract, retina, cornea, and dentine pulp. It has been thought that such tissue-specific stem cells vary on their degree of potentiality. However, it is still necessary to identify, for most tissues, the possible markers retained exclusively by specific populations of adult stem cells. For example, in some cases there is a lack of studies on genetic markers implying stem cells function in tissue maintenance.⁷⁵

Hematopoietic stem cells are currently the best characterized multipotent AST. Other populations of tissue-specific AST cells, which have been provisionally defined by their location or by anatomic criteria, are muscle satellite cells, epidermic stem cells, and intestinal stem cells. Recently, it was possible to identify two cell populations having stem cells features in an adult mouse's central nervous system: ependymary and astrocyte cells in the subventricular area.⁷⁸

The number of stem cells and their process of differentiation should be carefully regulated to fulfill the needs of regenerating tissue. Therefore, complex feedback signals have been developed to maintain an appropriate reserve of undifferentiated precursor cells and differentiated progeny. Thus, a stem cell can remain inactive and avoid entering into the cellular cycle; this may be important in order to retain a reserve of cells which may be used in stress events. Furthermore, a stem cell may suffer apoptosis and thus not contribute to a future development; this process may be typical in such tissues as the brain, where the division of differentiated cells (neurons and glial cells) is quite limited. In general terms, a dynamic equilibrium between proliferation, survival and differentiation signals ensures an appropriate balance of stem cells and differentiated cells throughout the individual's adult life.⁷³

The macroenvironment of AST is controlled by physical properties which regulate the metabolism, including temperature and oxygen levels, and circulation factors such as hormones and biologically active proteins. The microenvironment of AST is quite complex, as there are a great number of potential signal sources which may modify cell behavior. There are

Células troncales del adulto (CTA)

Es importante enfatizar que las células troncales no son exclusivas del embrión en desarrollo, sino que están presentes también en el tejido adulto, en donde son importantes en la homeostasis del organismo. Si bien es cierto que la diversificación celular termina generalmente después del nacimiento, los órganos pueden poseer un mecanismo para reemplazar a las células cuando éstas mueran, ya sea por desgaste, apoptosis o daño.^{73,74}

También debemos considerar que los diversos tejidos en el adulto son renovados a lo largo de la vida por poblaciones de células troncales, éstas son específicas para un linaje en particular. Su única propiedad es que pueden dividirse simétrica o asimétricamente, para producir una célula troncal idéntica y una célula progenitora parcialmente comprometida; esta última, aún cuando no esté totalmente diferenciada, tendrá una capacidad restringida de desarrollo. Por ello se toma a las CTA como tejido-específicas, capaces de originar sólo células progenitoras correspondientes a su tejido de origen.⁷⁵

Las células troncales que renuevan y reparan tejidos del adulto deben ser fuertes, capaces de resistir el estrés de los eventos asociados con el daño, como los procedimientos quirúrgicos, daños físicos, exposición a tóxicos, daño debido a calor o frío extremos. De hecho, las evidencias experimentales sugieren que las células troncales residentes en los tejidos adultos son extremadamente adaptables a las variaciones de temperatura, pH y a la exposición a tóxicos. Lo anterior sugiere que sus requisitos para sobrevivir son quizá mínimos, y que la dificultad para que las células troncales purificadas sean aisladas y propagadas exitosamente, podría relacionarse con la presencia, en muchos medios de cultivo, de factores que contribuyan a su diferenciación y subsecuente senescencia.⁷⁶

Estudios en que las células en mitosis son marcadas con bromodeoxi-uridina u otros precursores del ADN no sólo han permitido establecer la presencia de las células troncales en varios tejidos del cuerpo, también han proporcionado información sobre su localización, fenotipos de su progenie diferenciada y velocidad de sus ciclos. Dichos estudios han revelado una tremenda heterogeneidad en la cinética de producción de las células troncales y de diferenciación entre los tejidos.⁷³

Las CTA pueden dividirse en dos grandes grupos: *a*) las que darán origen sólo a las células propias de cada tejido u órgano (células progenitoras de tejido) y *b*) las que son capaces de originar distintos tipos celulares (células troncales multipotenciales).

Las células troncales en el adulto pueden encontrarse en muchos tejidos especializados del cuerpo,

soluble molecules released into tissues through the blood vessels, and soluble factors produced by the cells constituting the tissue. There are also extracellular matrix molecules providing structural support to tissue cells, but also capable of releasing signals that may modify cell behavior.⁷⁶ For each individual cell, the contact it has with its neighboring cells and with extracellular matrix components create a three-dimensional microenvironment which is unique for that individual cell. Moreover, the number of potential signaling molecules in each tissue is quite high and each cell does not respond individually to all available signals; the intrinsic properties of each cell determine its capacity to respond to a certain signal or combination of signals, and the degree of response of a cell might be controlled by a combination of intrinsic and extrinsic factors.⁷⁶

On the other hand, in the embryonic state, instead of stem cells specific factors acting in a small group of genes and beginning a sequence of activation events taking place as the cell progresses through differentiation, many or all of the tissue-specific genes might be a combination target for the so called sequence-specific factors. In preparing genes for their expression at later stages, this combination could lead to the recruitment of histone-modifying enzymes, to form closely located markers and thus generate epigenetic markers in the vicinity of genes. As ES cells differentiate, the combination with marked genes and other lineage-specific factors might lead to the recruitment of more chromatin modifiers and other complexes capable of activating gene transcription. As a result of these factors' activity, a vast epigenetically-modified region might be established in multipotent stem cells, expanding the mark to those genes having the potential to be expressed in lineages resulting from those cells, while the marks could disappear from the genes which are bound to remain inactive for a long time.⁷⁹

By virtue of the prolonged life span of stem cells, they must be kept free from damage. Protection niches are composed not only of stem cells, but also of a diverse collection of different types of neighboring differentiated cells which secrete and organize a rich extracellular matrix environment, and other factors allowing stem cells to manifest their unique intrinsic properties (self-renewing and generating differentiated cells at terminal stage). This means that the combination of stem cells intrinsic characteristics and their microenvironment constitutes their properties and defines their potential.⁷⁴ However, it is still unknown exactly when and how certain somatic stem cells niches are formed.

In niches, regulation of an equilibrium between stem cells symmetric and asymmetric divisions is critical, both in order to maintain an appropriate

incluyendo cerebro, médula ósea, hígado, piel, tracto gastrointestinal, retina y córnea, inclusive en la pulpa de la dentina. Se ha pensado que dichas células troncales tejido-específicas varían en el grado de potencialidad, a pesar de que aún faltan por identificar, para la mayoría de los tejidos, los posibles marcadores retenidos exclusivamente por poblaciones particulares de células troncales en el adulto; como la falta, en algunos casos, de estudios de marcadores genéticos que impliquen el funcionamiento de las células troncales en el mantenimiento de estos tejidos.⁷⁵

Las células troncales hematopoyéticas son las CTA multipotenciales mejor caracterizadas. Otras poblaciones de CTA tejido-específicas, que han sido provisionalmente definidas por su localización o por un criterio anatómico, son las células satélites musculares, las células troncales epidermales, y las células troncales intestinales. Hace poco se identificaron dos poblaciones celulares con propiedades de células troncales en el sistema nervioso central del ratón adulto: las células endoteliales y de astrocitos de la zona subventricular.⁷⁸

Para satisfacer las demandas del tejido en regeneración, el número de células troncales y el proceso de diferenciación de éstas, deben ser cuidadosamente regulados; por lo tanto, se han desarrollado señales de retroalimentación complejas para mantener una reserva apropiada de células precursoras indiferenciadas y de progenies diferenciadas. Así, una célula troncal puede permanecer inactiva y no entrar al ciclo celular, esto puede ser importante para secuestrar una reserva de células que pueden ser usadas en tiempos de estrés. También quizá una célula troncal sufra apoptosis y no contribuya a un futuro desarrollo; este proceso puede ser la norma en tejidos como el cerebro, donde la división de las células diferenciadas (neuronas y células de la glía) es muy escasa. De manera general, un balance dinámico entre señales de proliferación, sobrevivencia y diferenciación, asegura que se mantenga un equilibrio apropiado de células troncales y células diferenciadas a lo largo de la vida adulta del individuo.⁷³

El macroambiente de las CTA es controlado por propiedades físicas que regulan el metabolismo, como la temperatura y los niveles de oxígeno y factores en circulación como hormonas y proteínas biológicamente activas. El microambiente de las células es muy complejo, con muchas fuentes potenciales de señalización que pueden modificar el comportamiento celular. Hay moléculas solubles liberadas a los tejidos por los vasos sanguíneos, y factores solubles producidos por las células que componen el tejido. También existen moléculas de la matriz extracelular que proporcionan un soporte estructural para las células de los tejidos, pero que también son capaces de liberar señales que

number of stem cells inside the niche and to satisfy the demands to differentiate cells inside the surrounding tissue. Additionally, niches could orient asymmetric divisions in order to guide the flux and direction of compromised progeny.⁷⁴

For a daughter cell to become a stem cell, it must retain the factors allowing self-regeneration and inhibiting differentiation. For a daughter cell to proliferate and differentiate throughout a particular lineage, it must receive at least some factors typical of stem cells, so as to remain in that state and receive or inherit differentiation factors allowing to transcend it.⁷⁴

Although genetic programs related to stem cells self-regeneration and differentiation are still unknown to a great extent, available data indicate that the signaling paths of wingless gene, Hedgehog and Notch are involved in stem cells regulation.³⁶

The general aspects of AST which are currently best characterized are presented in the following section.

Hematopoietic stem cells (HSC)

Biological research on this type of cells has been the most extensive and has been conducted in mice. These studies have shown that adult HSC, derived from bone marrow, express different markers, such as receptor tyrosine kinase c-Kit (CD117) and stem cells antigen Sca-1. An additional cytosine receptor expressed in HSC is c-Mp1, which binds thrombopoietin. Murine HSC express sialomucin CD34 variably, depending on development status and cell cycle stage. Studies using fluorescent dye have also been used to define HSC. For instance, rhodamine 123 dye served to demonstrate that there is a great influx of this fluorochrome in the most primitive HSC, since cells not showing it presented few cell passes. Hoechst 33342 is another fluorescent dye used to isolate HSC fractions. Xenotransplants have also been used to test hematopoietic cells repopulation in humans.⁸⁰

Nowadays, clinical protocols including HSC enrichment in humans often use cell expression CD34.⁸¹

Furthermore, human bone marrow also contains a second type of mesenchymal stem cells, which have been named multipotent adult progenitor cells (MAPC). MAPC apparently can differentiate not only in all cell types derived from mesoderm stem cells (MSC) (including cells similar to skeletal muscle), but also in cells having progenitor endothelial cell properties.⁸²

Brain stem cells

Until recently, it was widely accepted that neurons did not regenerate after damage due to ischemia or

modifiquen el comportamiento celular.⁷⁶ Para cada célula individual, el contacto que tiene con sus células vecinas y los componentes de la matriz extracelular crean un microambiente tridimensional único para la célula. Más aún, el número de moléculas potenciales de señalización en cada tejido es muy grande y cada célula no responde de manera individual a todas las señales disponibles; las propiedades intrínsecas de cada célula determinan su capacidad para responder a una señal dada o a una combinación de señales, y el grado en que una célula responda quizá esté controlado por una combinación de factores intrínsecos y extrínsecos.⁷⁶

Por otra parte, en el estadio de células ES, en lugar de que los factores específicos de células troncales actúen en un grupo pequeño de genes, e inicien la secuencia de eventos de activación que toman lugar conforme la célula progresa por la diferenciación, varios o todos los genes específicos de tejido podrían ser blanco de unión de los llamados factores específicos de secuencia. En preparación de los genes para su expresión en estadios posteriores, esta unión podría llevar al reclutamiento de enzimas modificadoras de histonas, para formar marcadores localizados muy cercanamente, y generar así los marcadores epigenéticos en la vecindad de los genes. Conforme las células ES se diferencien, la unión a los genes marcados, de otros factores específicos de linaje, podrán conducir al reclutamiento de más modificadores de la cromatina y otros complejos activadores de la transcripción. Como consecuencia de la actividad de estos factores, una gran región modificada epigenéticamente podría ser establecida en las células troncales multipotenciales, expandiéndose la marca a los genes que tienen el potencial para ser expresados en los linajes que se originen de esas células, mientras que las marcas podrían desaparecer de los genes que están destinados a permanecer apagados durante mucho tiempo.⁷⁹

En vista del tiempo de vida tan prolongado de las células troncales, éstas deben ser mantenidas a salvo del daño. Los nichos de protección están compuestos no sólo de células troncales, sino también de una colección diversa de diferentes tipos de células vecinas diferenciadas que secretan y organizan un medio rico de matriz extracelular, y otros factores que permiten a las células troncales manifestar sus propiedades intrínsecas únicas (autorrenovarse y originar células diferenciadas en fase terminal). Esto último implica que la combinación de características intrínsecas de las células troncales y de su microambiente conforman sus propiedades y definen su potencial.⁷⁴ Sin embargo, aún no se conoce exactamente cuándo y cómo se forman muchos de los nichos de las células troncales somáticas.

En los nichos, la regulación de un equilibrio entre

other traumas. Nowadays, nervous stem cells (NSC) have been identified in a great number of locations in the adult brain.⁸³ Cultured neuronal precursors in the ventricular and subventricular area form colonies known as neurospheres. It has been demonstrated that neurosphere cultures contain peripheral nervous system cells and are capable of differentiating into neurons and glial cells.⁸⁴

Muscle stem cells

It is known that, in response to stress or trauma, inactive skeletal muscle tissue cells can normally be activated and regenerate tissue. Mononuclear myogenic progenitor cells, known as satellite cells, can be found between sarcolemma and basal layer of muscle fiber. These cells, upon being activated, generate myoblasts and begin the expression of myogenic regulating factors, such as Myf5 and MyoD, generating precursor daughter cells that undergo multiple division rounds before differentiating terminally with new or preexisting myofibrils. Since the total number of satellite cells is constant in adult muscle, by virtue of repeated regeneration cycles, it has been suggested that satellite cells form a population of monopotent stem cells.⁸⁵ There are studies which have identified peripheral nervous system cells in the mouse's skeletal muscle, involved in muscle regeneration.⁸⁶

Unlike skeletal muscle, but similarly to the case of nervous tissue, it has not yet been possible to demonstrate the ability of cardiac tissue to repair itself after a heart attack, despite the detection of active cycle cells in the region surrounding the site of the attack. Nevertheless, there has been recent evidence on the existence of stem cells in the heart.⁸⁷

Stem cells in other tissues

Several years have passed since the discovery of epithelia like the intestinal epithelium and the skin epithelium, which are able to efficiently regenerate. It is also known that stem cells regenerating these tissues have a high proliferation potential. In the skin, epithelial cells are derived from stem cells that adhere firmly to the basal layer on the bulge of the pilose follicle (skin with hair) (Figure 6).⁸⁸ Stem cells in the intestinal epithelium are located near the base of the intestinal crypts (Figure 7); from that point, differentiated cells migrate through the crypts until they reach the microhair apical surface, where they repopulate the intestinal epithelium and end their functional stage.⁸⁹ Notably, cells derived from the intestinal epithelium have molecular features in common with blood cells, such as the signaling path c-myc.⁹⁰

las divisiones simétricas y asimétricas de las células troncales es crítica, tanto para mantener un número apropiado de células troncales dentro del nicho como para cumplir las demandas para diferenciar células dentro del tejido circundante. Adicionalmente, los nichos podrían orientar las divisiones asimétricas con el fin de guiar el flujo y dirección de la progenie comprometida.⁷⁴

Para que una célula hija sea una célula troncal, ésta deberá retener los factores de autorrenovación e inhibitorios de diferenciación. Para que una célula hija destinada a proliferar y diferenciarse a lo largo de un linaje en particular, esta célula progenitora deberá recibir cuando menos algunos factores propios de las células troncales, con el fin de mantener este estado y recibir o heredar factores de diferenciación que lo superen.⁷⁴

Aunque los programas genéticos involucrados en la autorrenovación y diferenciación de las células troncales aún se desconocen, existen datos que indican que las vías de señalización de *wingless gene*, *Hedgehog* y *Notch* están involucradas en la regulación de las células troncales.³⁶

A continuación se mencionan los aspectos generales de las CTA mejor caracterizadas.

Células troncales hematopoyéticas (HSC)

El estudio biológico de este tipo de células ha sido el más extenso y se ha llevado a cabo en el ratón. Estos estudios han revelado que las HSC adultas, derivadas de médula ósea, expresan diferentes marcadores, como el receptor tirosina-cinasa c-Kit (CD117) y el antígeno de células troncales Sca-1. Un receptor adicional de citocinas expresado en las HSC es c-Mpl, que une trombopoyetina. Las HSC de murino expresan de manera variable la sialomucina CD34, dependiendo del estado de desarrollo y del estadio del ciclo celular. Los estudios con tinciones fluorescentes también se han usado para definir a las HSC. Por ejemplo, la tinción con rodamina 123 sirvió para demostrar que se da un gran influjo de este fluorocromo en las HSC más primitivas, ya que las células que no lo presentaron dieron pocos pasos celulares. El Hoechst 33342 es otra tinción fluorescente usada para el aislamiento de fracciones de HSC. También se han utilizado los xenotransplantes para ensayar la repoblación de células hematopoyéticas del humano.⁸⁰

Actualmente, los protocolos clínicos que incluyen el enriquecimiento de HSC del humano, generalmente utilizan la expresión celular CD34.⁸¹

Además, la médula ósea del ser humano también contiene un segundo tipo de células troncales mesenquimatosas, que han sido designadas como células progenitoras adultas multipotenciales (MAPC). Las

In the case of the pancreas and liver, it is known that their tissues can regenerate; however, stem cell isolation in these organs has been quite difficult.⁹⁰

Umbilical cord cells

The most widely known AST are the ones obtained from the umbilical cord at the moment of childbirth; these cells have been used to correct various anomalies of hematopoietic origin. Nowadays, there are several private and public laboratories which offer the service of retrieving these cells and preserving them by freezing, in order to keep them as a family deposit of stem cells which could someday be used by a family member.^{1,36}

It is also important to point out that there is little information regarding the molecular and cellular changes that happen to stem cells populations during aging. This lack of information is due, in part, to the fact that stem cells represent only a small percentage of all cells in a tissue; therefore, it has been difficult to obtain pure populations of stem cells in amounts sufficient to perform biochemical or molecular analyses. Moreover, in many cases stem cells cannot be identified *in situ*, not even ambiguously. This makes it difficult, for instance, to perform immunocytochemical or hybridization analyses.⁷³

Several studies have demonstrated that stem cells ability to respond to environmental demands could decrease during the process of aging. For example, the measuring of osteoprogenitor cells number in adult and old rats bone marrow revealed a significant decrease in number due to aging, as well as a decrease in the capacity of progenitor cells to form bone.⁹¹ Nevertheless, stem cells in old rats exhibit the ability to repopulate grafted host rats. That is, while during

MAPC aparentemente pueden diferenciarse no sólo en todos los tipos derivados de células troncales del mesodermo (MSC) (incluyendo células semejantes a músculo esquelético), sino también en células con propiedades de células endoteliales progenitoras.⁸²

Células troncales del cerebro

Hasta hace poco se aceptaba que después de un daño por isquemia o por algún otro trauma, no se renovaban las neuronas. Actualmente, en el adulto se han identificado células troncales nerviosas (NSC) en gran variedad de localizaciones en el cerebro.⁸³ Los precursores neuronales cultivados de la zona ventricular y subventricular, forman colonias que han sido llamadas neuroesferas. Se ha mostrado que los cultivos de neuroesferas contienen células del sistema nervioso periférico y son capaces de diferenciarse en neuronas y células de la glía.⁸⁴

Células troncales musculares

Se sabe que, normalmente, en respuesta a un estrés o algún trauma, las células inactivas del tejido muscular esquelético pueden ser activadas y regenerar el tejido. Las células progenitoras miogénicas mononucleares, llamadas células satélites, pueden encontrarse entre el sarcolema y la lámina basal de la fibra muscular. Este tipo de células, al ser activadas, originan mioblastos e inician la expresión de factores reguladores miogénicos como Myf5 y MyoD, generando células precursoras hijas que sufren múltiples rondas de división celular antes de diferenciarse de manera terminal con nuevas o preexistentes miofibrillas. Debido a que el número total de células satélites es constante en el músculo adulto, por ciclos repetidos de regeneración, se ha

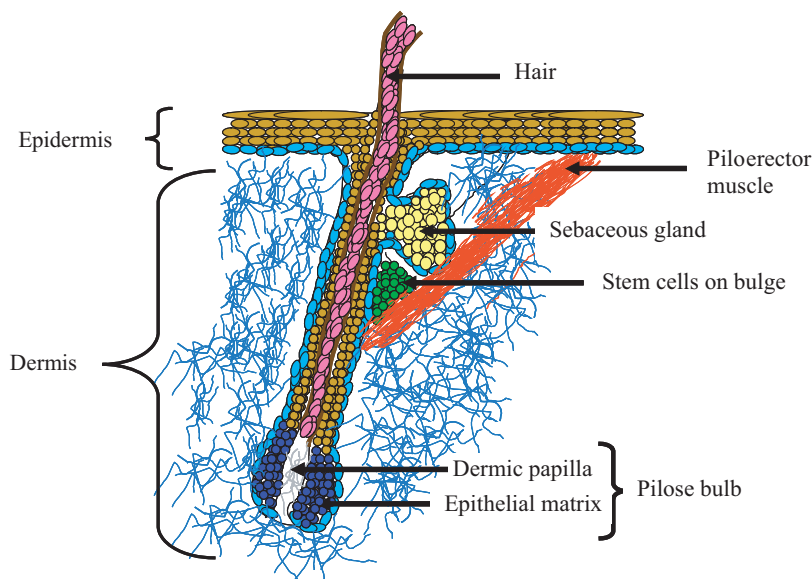


Figura 6: Células troncales del folículo piloso. Esquema de un folículo piloso donde se observa por debajo de la glándula sebácea la prominencia (*bulge*) de donde se originan las células troncales (imagen redibujada y modificada de la referencia 74).

Figure 6: Pilose follicle stem cells. Sketch of a pilose follicle showing the bulge from which stem cells originate, underneath the sebaceous gland (image redrawn and modified from reference 74).

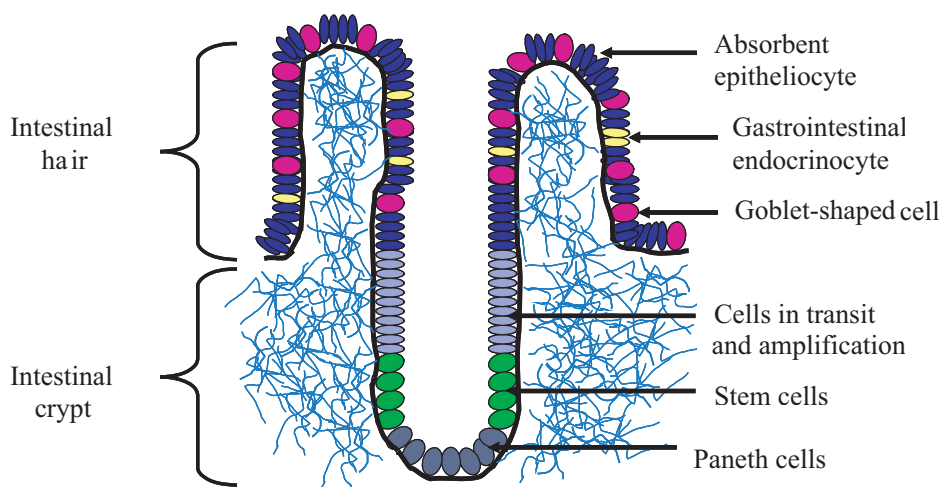


Figura 7: Células troncales del epitelio intestinal. Localización de las células troncales dentro de las criptas intestinales (imagen redibujada y modificada de la referencia 74).

Figure 7: Intestinal epithelium stem cells. Location of stem cells in intestinal crypts (image re-drawn and modified from reference 74).

aging the proliferative potential of hematopoietic stem cells could be maintained in basal conditions, their ability to respond to damage or disease might be compromised.

In conclusion, the mechanisms behind the changes in the ability of pluripotent stem cells to proliferate, differentiate or survive during aging are still unknown. Elements such as telomerases, signaling paths mediated by growth factors and cytosines, as well as oxidative stress, might be involved.⁷³

Main methods to obtain stem cells from adult tissues

In adults, stem cells have been obtained from the following tissues.

Peripheral blood

The obtention of hematopoietic stem cells from peripheral blood has replaced the obtention of stem cells from bone marrow for human transplants, since it constitutes a more simple and less painful procedure for the patient. In blood, there is normally one stem cell per each 100 thousand circulating cells, so it is necessary to give treatment previous to extraction, with hematopoietic and chemotherapeutic growth factors. The administration of the granulocyte colony stimulation factor (G-CSF) contributes to mobilization of bone marrow stem cells, which will appear three to five days later in peripheral blood. In order to obtain them, it is necessary to perform a "leukaphoresis", a procedure allowing to separate white cells from the blood while the rest of its components return to the bloodstream; there are several devices in the market that perform this procedure. When the separation (by filtration) of white blood cells is performed, it is necessary to carry out another cell selection to obtain only

sugerido que las células satélites forman una población de células troncales monopotenciales.⁸⁵ Existen estudios que han identificado células del sistema nervioso periférico en el músculo esquelético del ratón, involucradas en la regeneración muscular.⁸⁶

En contraste al músculo esquelético, pero similar al tejido nervioso, aún no se ha demostrado la habilidad del tejido cardíaco para repararse después de un infarto, a pesar de la detección de células en ciclo activo en la región periférica del sitio infartado; aunque hace poco se han acumulado evidencias sobre la existencia de células troncales en el corazón.⁸⁷

Células troncales en otros tejidos

Desde hace varios años se conocen epitelios como el del intestino y de la piel, que pueden regenerarse eficientemente y que las células troncales que regeneran estos tejidos tienen un gran potencial de proliferación. En la piel, las células epiteliales se derivan de células troncales que se adhieren firmemente a la lámina basal en la prominencia (en inglés *bulge*) del folículo piloso (en la piel con pelo) (Figura 6).⁸⁸ Las células troncales del epitelio intestinal se localizan hacia la base de las criptas intestinales (Figura 7); desde ese punto, las células diferenciadas migran a lo largo de las criptas hasta ubicarse en la superficie apical de las microvellosidades donde repoblan el epitelio intestinal y finalizan su etapa funcional.⁸⁹ De manera notable, las células derivadas del epitelio intestinal tienen rasgos moleculares comunes a las células sanguíneas, como la vía de señalización c-myc.⁹⁰

Para el caso del páncreas y el hígado, se sabe que sus tejidos pueden regenerarse; sin embargo, el aislamiento de células troncales en estos órganos ha sido muy difícil.⁹⁰

hematopoietic stem cells; nowadays, the most widely used method is cell selection by magnetic pearls, a technique performed using commercial packages.^{92,93}

Umbilical cord blood

The obtention of stem cells from umbilical cord blood takes place after childbirth; the end of the cord still attached to the mother is used, while the placenta remains inside the uterus. To drain the blood it is necessary to press the cord and collect the contents in a sterile recipient containing CPD-A as anticoagulant. To separate hematopoietic stem cells (CD34+) from the fraction of mononuclear cells, the blood obtained from the umbilical cord is centrifuged in a Ficoll gradient.⁹⁴ To purify a specific population of hematopoietic stem cells, it is possible to use commercial packages of magnetic micropearls.

Complete bone marrow

To obtain stem cells, femur bone marrow lavages are performed; bone marrow is obtained through surgical procedures in the animal to avoid contamination and thus obtain as many cells as possible; the collected cells are suspended in Dulbecco Medium Eagle Modified (DMEM), enriched with 10% foetal bovine solution, and then the type of cells to be isolated is selected. There are two types of stem cells that can be isolated from bone marrow: hematopoietic stem cells and mesenchymal stem cells. Commercial packages employing magnetic pearls are used to separate those cells; the type of antibodies used to mark the cells varies among packages.⁹⁵

Nervous tissue

Glial progenitor cells (stem cells) have been identified in the white subcortical substance of the adult brain; these stem cells have been isolated by means of a fluorescence-activated cellular selection (FACS), either by transfection of fluorescent green protein or by immunologically marking cells. Isolated stem cells have generated oligodendrocytes and, to a lesser extent, neurons.⁹⁶

Discussion

Stem cells have been studied for more than four decades. This review presents information covering from the identification and initial description of stem cells in several organs, to the development of cell lines in various species, among which is the human species. It is clear that there are scientific bases and methodology necessary to achieve isolation and characterization of

Células del cordón umbilical

Las CTA más conocidas son las que se obtienen del cordón umbilical en el momento del parto; estas células se han utilizado para corregir diversas anomalías de origen hematopoyético. En la actualidad existen diversos laboratorios privados y públicos que prestan el servicio de recuperación de estas células, para después preservarlas en congelación como un almacén familiar de células troncales que pudieran ser utilizadas por algún miembro de la familia en un momento específico.^{1,36}

Asimismo, es importante señalar que se dispone de poca información concerniente a los cambios moleculares y celulares que le ocurren a las poblaciones de células troncales durante el envejecimiento. Esta falta de información, en parte, se debe a que las células troncales representan sólo un pequeño porcentaje de todas las células de un tejido; por lo tanto, ha sido difícil obtener poblaciones puras de células troncales en cantidades suficientes para realizar diferentes análisis bioquímicos o moleculares. Más aún, en muchos casos las células troncales no pueden ser ni ambiguamente identificadas *in situ*, ello dificulta, por ejemplo, efectuar análisis inmunocitoquímicos o de hibridación.⁷³

Varios estudios han proporcionado evidencias de que la habilidad de las células troncales para responder a las demandas ambientales podrían disminuir durante el envejecimiento. Por ejemplo, la medición del número de células osteoprogenitoras en la médula ósea de ratas adultas y viejas reveló disminución significativa en número, con el envejecimiento, también como decremento en la capacidad de las células progenitoras para formar hueso.⁹¹ Sin embargo, las células troncales en el ratón viejo exhiben habilidad para repoblar ratones huéspedes injertados. Es decir, mientras que durante el envejecimiento, el potencial proliferativo de las células troncales hematopoyéticas podría estar mantenida a condiciones basales, su habilidad para responder a un daño o enfermedad podría estar comprometida.

En conclusión, aún no se conocen los mecanismos que sostengan los cambios en la habilidad de las células troncales pluripotenciales para proliferar, diferenciarse o sobrevivir durante el envejecimiento. Quizá estén involucrados elementos como las telomerasas, vías de señalización mediadas por factores de crecimiento y citocinas y el estrés oxidativo.⁷³

Principales métodos para obtener células troncales de tejidos adultos

En los adultos se han obtenido células troncales provenientes de los siguientes tejidos.

embryonic and adult stem cells, which respectively have pluripotent and multipotent characteristics. The first comprises the capacity of cells to transform from an undifferentiated initial state until generating any of the cell types found in an organism. The second allows to maintain tissues with a constant cell population performing specific functions. However, it is important to point out that, until the present day, most of the embryonic stem cells having pluripotent characteristics correspond to mice, and these have been used mainly to establish animal models which would allow to study human diseases. In humans, established stem cell lines have been characterized by means of different molecular markers,²⁴ but it is not possible to determine if their characteristics are pluripotent or multipotent, since current world legislations do not allow human stem cells to be injected into embryos; that is, it is not allowed to create "chimeric or transgenic humans".

In domestic animals, among which are productive species as bovine, ovine, porcine, etc., the number of embryonic pluripotent and multipotent stem cells lines mentioned is quite limited. This means that there is an enormous universe where a great number of research lines on embryonic stem cells may be developed. In the field of veterinary medicine, there is the advantage that regulations are less strict than the legislation governing research in humans. This allows to develop a huge range of studies, including genic therapy and production of transgenic animals.

Lastly, although studies on stem cells have allowed to know some aspects of the mechanisms regulating the differentiation process, many aspects are still unknown; therefore, the use of stem cells is not exempt from danger.

Referencias

1. Shihabuddin LS, Ray J, Gage FH. Stem cells technology for basic science and clinical applications. *Arch Neurol* 1999;56:29-32.
2. Gepstein L. Derivation and potential application of human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002; 91:866-876
3. Guerrero-Mothelet V. Células troncales: la controversia. ¿Cómo ves?, UNAM 2003;62:10-14.
4. Till J, McCulloch E. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961;14:213-222.
5. Becker A, McCulloch E, Till J. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963;197:452-454.
6. Kleinsmith LJ, Pierce GB. Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res* 1964;24:1544-1551.
7. Cole RJ, Edwards RG, Paul J. Cytodifferentiation and

Sangre periférica

La obtención de células troncales hematopoyéticas a partir de sangre periférica ha sustituido la obtención de células troncales de médula ósea para trasplantes en humanos, debido a que constituye un procedimiento más sencillo y menos doloroso para el paciente, normalmente en sangre se puede encontrar una célula troncal por cada 100 mil 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, que aparecerán de tres a cinco días después en la sangre periférica; para obtenerlas se realiza una "leucoforesis"; 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 este procedimiento. Cuando se realiza la separación (por filtración) de las células blancas, se debe realizar otra selección celular, con el fin de obtener únicamente las células troncales hematopoyéticas; en la actualidad el método más utilizado es la selección celular por medio de perlas magnéticas, técnica que se realiza con la utilización de paquetes comerciales.^{92,93}

Sangre de cordón umbilical

La obtención de células troncales de la sangre del cordón umbilical se efectúa después del parto; con este propósito, se utiliza el extremo del cordón unido a la madre, mientras la placenta sigue dentro del útero. Para drenar la sangre se ejerce presión sobre el cordón y se recolecta el contenido en un recipiente estéril que contiene CPD-A como anticoagulante. Para separar las células troncales hematopoyéticas (CD34+) de la fracción de células mononucleares, se centrifuga la sangre obtenida del cordón umbilical en un gradiente de Ficoll.⁹⁴ Si se desea purificar una población específica de células troncales hematopoyéticas, se pueden utilizar los paquetes de microperlas magnéticas.

Médula ósea completa

Para obtener las células troncales se realizan lavados de la médula ósea que se encuentra en el fémur, la cual se obtiene mediante procedimientos quirúrgicos en el animal para evitar contaminación y así obtener mayor número de células; las células recolectadas se suspenden en el medio Eagles's modificado de Dulbecco (DMEM) enriquecido con 10% de suero fetal bovino, y después se realiza una selección del tipo de células que se requiera aislar. Existen dos tipos de célu-

- embryogenesis in cell colonies and tissue cultures derived from ova and blastocysts of the rabbit. *Dev Biol* 1966; 13 (3):385-407.
8. Gardner RL. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature* 1968; 220:596-597.
 9. Mintz B, Illmensee K. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Nat Acad Sci* 1975; 72 (9):3585-3589.
 10. Solter D, Knowles BB. Monoclonal antibody defining a stage specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Nat Acad Sci* 1978; 75:5565-5569.
 11. 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.
 12. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292:154-156.
 13. Gossler A, Doetschman T, Korn R, Serfling EK. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Nat Acad Sci* 1986;83:9065-9069.
 14. Donovan PJ, Scott D, Cairns LA, Heasman J, Wylie CC. Migratory and post-migratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 1986;44:831-838.
 15. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988; 336 (6200):684-687.
 16. Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989; 244:1288-1292.
 17. Eistetter HR. Pluripotent embryonic stem cell lines can be established from disaggregated mouse morulae. *Dev Growth Differ* 1989;31:275-282.
 18. Pease S, Braghetta P, Gearing D, Grail D, Williams L. Isolation of embryonic stem (ES) cells in media supplemented with recombinant leukemia inhibitory factor (LIF). *Dev Biol* 1990; 141 (2):244-352.
 19. Wood SA, Allen ND, Rossant J, Auerbach A, Nagy A. Non-injection methods for the production of embryonic stem cell-embryo chimeras. *Nature* 1993;365(6441):87-89.
 20. Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod* 1994; 9:2110-2117.
 21. Cherny RA, Stokes TM, Merein J, Lom L, Brandon MR, Williams L. Strategies for the isolation and characterization of bovine embryonic stem cells. *Reprod Fertil Dev* 1994;6:569-575.
 22. Schoonjans L, Albright GM, Li J, Collen D. Pluripotent rabbit embryonic stem (ES) cells are capable of forming overt coat color chimeras following injection into blastocysts. *Mol Reprod Dev* 1996;45:439-443.
 23. Shim H, Gutierrez-Adan A, Chen LR, BonDurant RH, Behboodi E, Anderson GB. Isolation of pluripotent stem cells from cultured porcine primordial germ cells. *Biol Reprod* 1997;57:1089-95.
 24. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS *et al.* Embryonic stem

las troncales que se pueden aislar de la médula ósea: las troncales hematopoyéticas y las troncales mesenquimales. Para separar dichas células se emplean paquetes comerciales que utilizan perlas magnéticas, en éstas varía el tipo de anticuerpos que se utilicen para marcar las células.⁹⁵

Tejido nervioso

En la sustancia blanca subcortical del cerebro adulto se han identificado células progenitoras de la glía (troncales); estas células troncales se han aislado por medio de una selección celular activada por fluorescencia (FACS), sea por transfección de proteína verde fluorescente o al marcar las células inmunológicamente. Las células troncales aisladas han dado origen a oligodendrocitos y, en menor cantidad, a neuronas.⁹⁶

Discusión

El estudio de las células troncales tiene más de cuatro décadas, en esta revisión se presenta la información que abarca desde la identificación y descripción inicial de este tipo de células en diversos órganos, hasta el desarrollo de líneas celulares en diversas especies, entre ellas el humano. En principio queda claro que se tienen las bases científicas y la metodología para lograr el aislamiento y caracterización de células troncales embrionarias y adultas, que tienen características pluripotenciales y multipotenciales, respectivamente. La primera comprende la capacidad de las células para transformarse desde un estado inicial indiferenciado hasta generar cualquiera de los tipos celulares de un organismo. La segunda permite mantener los tejidos con una población constante de células que cumplan funciones específicas. Sin embargo, es importante resaltar que hasta hoy, la mayoría de células troncales embrionarias que tienen características pluripotenciales corresponden a ratones y que éstos se han utilizado principalmente para establecer modelos animales que permiten el estudio de enfermedades que afectan al hombre. En los humanos, las líneas de células troncales establecidas se han caracterizado con base en diferentes marcadores moleculares,²⁴ pero no puede establecerse si sus características son pluripotenciales o multipotenciales, porque las legislaciones actuales en el ámbito mundial no permiten que las células troncales humanas sean inyectadas en embriones; o sea no se permite crear "humanos quiméricos o transgénicos".

En los animales domésticos, entre los cuales se encuentran especies productivas como bovinos, ovinos, porcinos, etc., el número de líneas de células troncales embrionarias pluripotenciales y multipoten-

cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282:1145-1147.

25. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ *et al.* Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Nat Acad Sci* 1999; 96(3): 1162.
26. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284 (5411):143-147.
27. Iwasaki S, Campbell K, Galli C, Akiyama K. Production of live calves derived from embryonic stem-like cells aggregated with tetraploid embryos. *Biol Reprod* 2000;62:470-475.
28. Vassilieva S, Guan K, Pich U, Wobus A. Establishment of SSEA-1 and Oct-4- Expressing Rat embryonic Stem-like Cell lines and Effects of Cytokines of the IL-6 Family on Clonal Growth . *Exp Cell Res* 2000;258:361-373.
29. Saito S, Ugai H, Sawai K, Yamamoto Y, Minamihashi A, Kurosaka K *et al.* Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation *in vitro*. *FEBS Letters* 2002;531:389-396.
30. Hübner K, Fuhrmann G, Christenson L, Kehler J, Reinbold R, De la Fuente R *et al.* Derivation of Oocytes from Mouse Embryonic Stem Cells. *Science* 2003;300:1251-1256.
31. Cheong C, Hong KU, Lee HW. Mouse models for telomere and telomerase biology. *Exp Mol Med* 2003;35:141-153.
32. Ruhnke M, Ungefroren H, Zehle G, Bader M, Kremer B, Fändrich F. Long-Term Culture and differentiation of rat Embryonic Stem Cell-like Cells into Neuronal, Glial, Endothelial, and Hepatic lineages. *Stem Cells* 2003;21:428-436.
33. Horiuchi H, Tategaki A, Yamashita Y, Hisamatsu H, Ogawa M, Noguchi T. Chicken leukemia inhibitory factor maintains chicken embryonic stem cells in the undifferentiated state. *J Biol Chem* 2004;279:24514-24520.
34. Park S, Lee KS, Lee YS, Shin HA, Cho HY, Wang KC *et al.* Generation of dopaminergic neurons *in vitro* from human embryonic stem cells treated with neurotrophic factors. *Neuroc Lett.* 2004;359:99-103.
35. Van der Kooy D, Weiss S. Why Stem Cells? *Science* 2000;287:1439-1441.
36. Marshak D, Gardner R, Gottlieb D. *Stem Cell Biology.* Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
37. Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RL, Schwartz RE, Keene CD, Ortiz-Gonzalez X *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002;418:41-49.
38. Kon CJ, Atala A. Therapeutic cloning and tissue engineering. *Curr Top Dev Biol.* 2004; 60:1-15
39. 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.
40. Gearing DP, Nicola NA, Metcalf D, Foote S, Willson

ciales que se menciona es muy reducido, ello permite que exista un universo inmenso donde se realice gran cantidad de líneas de investigación dirigidas a incursionar en el mundo de las células troncales embrionarias. En el campo de la medicina veterinaria se tiene la ventaja de que no existen legislaciones tan estrictas, como las que rigen y norman a las investigaciones humanas; lo que permite desarrollar enorme gama de investigaciones, entre ellas la terapia génica y la producción de animales transgénicos.

Finalmente, aunque el estudio de las células troncales ha permitido conocer algunos aspectos acerca de los mecanismos que regulan el proceso de diferenciación, faltan aún muchos aspectos por comprender; en consecuencia, su empleo no está exento de peligro.

TA, Gough M *et al.* Production of leukemia inhibitory factor in *Escherichia coli* by a novel procedure and its use in maintaining embryonic stem cells in culture. *Bio-technology* 1989;7:1157-1161.

41. Mummery C, Feyen A, Freund E, Shen S. Characteristics of embryonic stem cell differentiation: a comparison with two embryonal carcinoma cell lines. *Cell Differ Dev* 1990;30:195-206.
42. Hilton DJ, Gough NM. Leukemia inhibitory factor: a biological perspective. *J Cell Biochem* 1991;46:21-26.
43. Hilton DJ. LIF: lots of interesting functions. *Trend Biochem Sci* 1992;17:72-76.
44. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BLM. Derivation of pluripotent embryonic stem cells from murine germ cells in culture. *Cell* 1992;70:841-847.
45. Ibelgauts, H. *Dictionary of Cytokines.* New York: VCH Publishers Inc, 1995.
46. Funston R, Nauta W, Seidel G. Culture of bovine embryos in Buffalo Rat liver Cell-conditioned Media or with Leukemia Inhibitory Factor. *J Anim Sci* 1997;75:1332-1336.
47. Moore K, Piedrahita JA. The effects of human leukemia inhibitory factor (hLIF) and culture medium on *in vitro* differentiation of cultured porcine inner cell mass. *In vitro Dev Biol Animal* 1997;33:62-71.
48. Amit M, Shariki C, Margulets V, Itskovitz-Eldor J. Feeder Layer- and serum-free culture of human Embryonic Stem Cells. *Biol Reprod* 2004; 70:837-845.
49. Ling V, Neben S. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells: Immunophenotypic analysis of cultured embryoid bodies. *J Cell Physiol* 1997; 171:104-115.
50. Gage FH. Mammalian Neural Stem Cells. *Science* 2000; 287:1433-1438.
51. Chan A, Dominko T, Luetjens C, Neuber E, Martinovich C, Hewitson L *et al.* Clonal propagation of primate offspring by embryo splitting. *Science* 2000; 287:317-319.
52. Hadjantonakis A, Papaioannou V. The stem cells of early embryos. *Differentiation* 2001;68(4-5):159-166.
53. Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp P. Hype and reality. *Hematology* 2002; 1: 369-391.

54. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000; 287:1427-1430.
55. Martin GR. Teratocarcinomas and mammalian embryogenesis. *Science* 1980;209:768-776.
56. O'Shea KS. Embryonic stem cell models of development. *Anat Rec* 1999;257:32-41.
57. Brook F A, Gardner R L. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Nat Acad Sci USA* 1997; 94:5709-5712.
58. Artzt K, Dubois P, Bennett, 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.
59. Robertson EJ. Embryo-derived stem cell lines. In: EJ Robertson, editor, *Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach*. Oxford, UK.: IRL Press, 1987.
60. Shambloott MJ, Axelman J, Littlefield JW, Blumenthal PD, Huggins GR, Cui Y *et al*. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively *in vitro*. *Proc Nat Acad Sci* 2001;98:113-118.
61. Pesce M, Anastassiadis K, Scholer HR. Oct-4: lessons of totipotency from embryonic stem cells. *Cell Tiss Org* 1999;165:144-152.
62. Talbot NC, Rexroad JR, Pursel VG, Powell AM. Alkaline phosphatase staining of pig and sheep epiblast cells in culture. *Mol Reprod Dev* 1993;36:139-147.
63. Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E. *Manipulating the mouse embryo*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
64. Bianco P, Robey PG. Stem cells in tissue engineering. *Nature* 2001;414: 118-121.
65. Voss AK, Thomas T, Gruss P. Germ line chimeras from female ES cells. *Exp Cell Res* 1997;230:45-49.
66. McWhir J. Biomedical and agricultural applications of animal transgenesis. *Methods Mol Biol* 2002;180:3-23.
67. Saito S, Sawai K, Ugai H, Moriyasu S, Minamihashi A, Yamamoto Y *et al*. Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. *Biochem Biophys Res Comm* 2003; 309:104-113.
68. Wood SA, Pascoe WS, Schmidt C, Kemler R, Evans MJ, Allen ND. Simple and efficient production of embryonic stem cell-embryo chimeras by coculture. *Proc Nat Acad Sci* 1993;90:4582-4585.
69. Beddington RSP, Ropberton EJ. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 1989; 105:733-737.
70. Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and man. *Ann Rev Cell Dev Biol* 2001;17: 435-462.
71. Verfaillie CM, Schwartz R, Reyes M, Jiang Y. Unexpected potential of adult stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 996:231-234.
72. Solter D, Knowles B. Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proc Nat Acad Sci* 1975; 72: 5099-5102.
73. Rao MS, Matton MP. Stem cells and aging: expanding the possibilities. *Mech Ageing Dev* 2001; 122:713-734.
74. Fuchs E, Tumber T. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 2004; 116:769-778.
75. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Nature* 2004; 116:639-648.
76. Presnell SC, Petersen B, Heideran M. Stem cells in adult tissues. *Cell Dev Biol* 2002; 13:369-376.
77. Henningson CT, Stanislaus MA, Gewirtz AM. Embryonic and adult stem cell therapy. *J Allergy Clin Immunol* 2003;S745-S753.
78. 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.
79. Szatorisz H, Dillon N. The epigenetic basis for embryonic stem cells pluripotency. *BioEssays* 2005; 27:1286-1293.
80. McIister I, Wolf NS, Pietrzyk ME, Rabinovitch PS, Priestley G, Jaeger B. Transplantation of hematopoietic stem cells obtained by a combined dye method fractionation of murine bone marrow. *Blood* 1990; 75:1240-1246.
81. Shpall EJ, Jones RB, Bearman SI, Franklin WA, Archer PG, Curiel T *et al*. Transplantation of enriched CD34-positive autologous marrow into breast cancer patients following high-dose chemotherapy: influence of CD-34 positive peripheral-blood progenitors and growth factors on engraftment. *J Clin Oncol* 1994; 12:28-36.
82. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M *et al*. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD 34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952-958.
83. Kruger GM, Morrison SJ. Brain repair by endogenous progenitors. *Cell* 2002; 110:399-402.
84. Hulspar R, Quesenberry PJ. Characterization of neurosphere cell phenotypes by flow cytometry. *Cytometry* 2000; 40:245-250.
85. Seale P, Rudnicki MA. A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 2000; 218:115-124.
86. Gussoni D, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF *et al*. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999;401:390-394.
87. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S *et al*. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 2003; 114:763-776.
88. Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Nat Acad Sci* 2003;110 Suppl 1:11830-11835.
89. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature* 2001; 414: 98-104.
90. Stappenbeck TS, Mills JC, Gordon JL. Molecular features of adult mouse small intestinal epithelial progenitors. *Proc Nat Acad Sci* 2003; 100: 1004-1009.
91. Quarto R, Thomas D, Liang CT. Bone progenitor cell deficits and the age-associated decline in bone repair capacity. *Calcif Tissue Int* 1995; 56:123-129.
92. Gratwohl A, Passweg J, Kuhne T, Tyndall A, Holzgreve W, Skoda R *et al*. Transplantation de cellules souches

- hématopoïétiques. *Forum Med Suisse* 2002; 25:597-606.
93. Rowley SD, Loken M, Radich J, Kunkle LA, Mills BJ, Gooley T *et al.* Isolation of CD34+ cells from blood stem cell components using the Baxter Isolex system. *Bone Marrow Transplant* 1998; 21: 1253-1262.
94. Belvedere O, Feruglio C, Malangone W, Bonora ML, Donini A *et al.* Phenotypic Characterization of Immunomagnetically Purified umbilical Cord Blood CD34+ Cells. *Blood Cells Mol Dis* 1999; 25: 140-145.
95. Avital A, Inderbitzin D, Aoki T, Tyan DB, Cohen AH, Ferraresso C *et al.* Isolation, Characterization and Transplantation of Bone Marrow-Derived Hepatocyte Stem Cells. *Biochem and Biophys Res Commun* 2001; 288:156-164.
96. Nunes MC, Roy NS, Keyoung HM, Goodman RR, McKhann G 2nd, Jiang L *et al.* Identification and isolation of multipotential neural progenitor cells from the subcortical white matter of the adult human brain. *Nat Med* 2003; 9: 439-447.