

Artículo de revisión

Células madre y células troncoembrionarias: Diferencias biológicas

Stem cells and embryonic stem cells: Biological differences

Dolly Macías Riveros*+ Juan Carlos Vázquez Chagoyán* Rogelio Alonso Morales**
Marco Cajero Juárez***

Abstract

The stem cells have been classified in three types according to their natural niche of origin, aptitude and differential function: totipotent, pluripotent and multipotent; the first, called embryonic stem cells (ES) originate from the morulae; the second, come from the inner cell mass of the blastocyst (ICM); and the third, known as multipotent adult progenitor cells (MAPC) are found in some adult tissues. The biological difference lies in their capabilities to produce cell lines, the totipotentials have the faculty to originate a complete organism, the pluripotent can generate all the cellular types and even the germinal line and the multipotentials can derivate in specific lineages. The stem cells are able to self-renew, and originate daughter-cells compromised with certain development routes; they are characterized for their indefinite division and are morphologically and functionally differentiated. When the stem cells and some progenitor types are extracted from their natural environment and are grown *in vitro*, in suitable medium, can be transfected and remain in an undifferentiated state without losing their potentiality; thus, when they are reintegrated to blastocyst receptors they are able to go on with their development. The study and compilation of information about these biological qualities of differential function, as well as their usefulness in homologous recombination and production of animal models that generate recombinant proteins, applicable for preventive-regenerating medicine and treatment of diseases, constitute the aim of this work.

Key words: PROGENITOR CELLS, STEM CELLS, HOMOLOGOUS RECOMBINATION, GENE TARGETING, RECOMBINANT PROTEINS, TRANSGENIC ANIMALS.

Resumen

Las células madre o progenitoras se han clasificado según su lecho natural de derivación, su aptitud y su función diferencial, en tres tipos: totipotenciales, pluripotenciales y multipotenciales; las primeras, llamadas células madre embrionarias, derivadas del cigoto en estadio de mórula; las segundas, provenientes de la masa celular interna (MCI) del blastocisto; las terceras, denominadas células madre somáticas, se encuentran en algunos tejidos adultos. La diferencia biológica radica en su capacidad para producir diversos linajes celulares; las totipotentes están biológicamente aptas para dar origen a un organismo completo; las pluripotentes pueden generar todos los tipos celulares, incluida la línea germinal; y las multipotentes pueden derivar en linajes específicos. Las células troncales tienen la capacidad de autorrenovación y de originar células hijas comprometidas con determinadas rutas del desarrollo; se caracterizan porque se dividen indefinidamente y además se diferencian de manera mor-

Recibido el 14 de agosto de 2006 y aceptado el 18 de enero de 2007.

*+Programa de Estudios de Posgrado, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México; Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Km 15.5, carretera Panamericana, tramo Toluca-Atlacomulco, San Cayetano de Morelos, Estado de México, México, Telefax: (722) 296 5555, 296 8980, responsable de correspondencia, correo electrónico: marmac4@uaemex.mx

*Programa de Estudios de Posgrado, Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma del Estado de México, Km 15.5, Carretera Panamericana, tramo Toluca-Atlacomulco, San Cayetano de Morelos, Estado de México, México, Telefax: (722) 296 5555, 296 8980, correo electrónico: jvcv@uaemex.mx

**Laboratorio de Genética y Biología Molecular, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México, D. F., Telefax: 01 555 622 5956, correo electrónico: ralonsom@servidor.unam.mx

***Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Michoacana San Nicolás de Hidalgo, Km 9.5, carretera Morelia-Zinapécuaro, Posta Veterinaria, Morelia, Michoacán, México, Telefax: (443) 295 8029, correo electrónico: cajeromarco@hotmail.com

fológica y funcional. Cuando las células troncoembrionarias y algunos tipos de células progenitoras se extraen de su entorno natural y se cultivan *in vitro*, en medios adecuados, pueden ser transfectadas y se mantienen indiferenciadas, sin perder su potencial; así, al reintroducirse a blastocistos receptores continúan su desarrollo. El estudio y la compilación de información acerca de estas cualidades biológicas de función diferencial, así como su utilidad para aprovechar la recombinación homóloga y para producir modelos animales que generen proteínas recombinantes, aplicables en medicina preventiva-regenerativa y tratamiento de enfermedades, constituyen el objetivo de este trabajo.

Palabras clave: CÉLULAS PROGENITORAS, CÉLULAS TRONCALES, RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA, MUTAGÉNESIS DIRIGIDA, PROTEÍNA RECOMBINANTE, TRANSGÉNESIS ANIMAL.

Introduction

For eukaryote organisms, among them mammals, the basic structural and functional unity is the cell, whose nucleus possesses the complete information for each specific protein synthesis.¹

Starting from only one cell, the fertilized egg must divide and differentiate in a coordinated form, temporal and spatial form, to generate nearly 240 different types of cells that conform the mature organism;² it is constituted by diploid cells (2n), called somatic, and the ones with haploid chromosomal number (n), denominated gamete or sexual; from there on, these last develop new individuals, as the codified genetic program by the nucleotides, which precise order determines the genome of each species and each individual.³

In this natural process four main factors intervene: a) cellular proliferation, which increments the cell number, but they do not differentiate; b) the migration, that promotes pattern formations or morphogenesis to establish embryonic axes; c) the spatial organization of the cells, which induces propagation of some and death of others; and d) the differentiation, process by which new cellular types are expressed.⁴

This biological program is executed by gene circuit regulators that “turn on and off”, controlling the biochemical activity of the cell at molecular level, according to its organization level and stage of development.⁵

When the embryonic genome is activated, a series of mitotic divisions which contribute to define cellular destiny by means of gradual liberation and restriction of the expression potential in each lineage is initiated; lastly, this leads to the formation of cellular types, generated under the influence of the surroundings of each cell, in embryonic changing specific niches.⁶

The existence of embryonic cells and somatic progenitors, which lineages precede from the blastocyst and from adult tissue, has generated a controversial field of study, where proliferation characteristics and derivation of these cells in the three germ layers, with capacity to maintain their *in vitro* potential, migrate

Introducción

Para los organismos eucariontes, entre ellos los mamíferos, la unidad estructural y funcional básica es la célula, cuyo núcleo posee la información completa para cada síntesis proteínica específica.¹

Partiendo de una sola célula, el huevo fertilizado debe dividirse y diferenciarse de forma coordinada, temporal y espacialmente, para generar cerca de 240 diferentes tipos de células que conforman al organismo maduro;² se constituye por células diploides (2n), llamadas somáticas, y las de número cromosómico haploide (n), denominadas gaméticas o sexuales; a partir de estas últimas se desarrollan nuevos individuos, según el programa genético codificado por los nucleótidos, cuyo orden preciso determina el genoma de cada especie.³

En este proceso natural intervienen cuatro factores fundamentales: a) la proliferación celular, que incrementa el número de células, pero no las diferencia; b) la migración, que promueve la formación de patrones o de morfogénesis para establecer los ejes embrionarios; c) la organización espacial de las células, que induce la propagación de unas y la muerte celular de otras; y d) la diferenciación, proceso por el cual se expresan nuevos tipos celulares.⁴

Este programa biológico es ejecutado por circuitos reguladores de genes que se “prenden y apagan”, controlando la actividad bioquímica de la célula a nivel molecular, según su grado de organización y estado de desarrollo.⁵

Cuando el genoma embrionario se activa, se inicia una serie de divisiones mitóticas que contribuyen a definir el destino celular mediante la liberación y restricción paulatina del potencial de expresión en cada linaje, esto último lleva a la formación de tipos celulares, generados bajo la influencia del entorno que rodea a cada célula, en nichos específicos cambiantes del embrión.⁶

La existencia de células embrionarias y progenitoras somáticas, cuyos linajes provienen del blastocisto y de los tejidos adultos, ha generado un controvertido campo de estudio, donde se aprovechan las caracterís-

and integrate, originating the possibility to produce and recuperate tissue.⁷

Other cells that have the capacity to generate different lineages originate from embryonic teratocarcinoma (ECC, embryonic carcinoma cells).⁸ Teratocarcinomas are gonad tumors that contain tissue from the three embryonic germ layers,⁹ useful as cellular models for research,^{8,9} but with the disadvantage of being aneuploid cells; besides, the results that *in vitro* seem convincing might not have the same *in vivo* response, due to redundancy and cellular interaction that are not reproduced in the culture dish.¹⁰

While the potentiality and stable karyotype of embryonic and adult stem cells constitute a powerful instrument, that added to gene targeting technique allows to venture in developmental biology from another perspective, in animal production, preventive and regenerative medicine, as well as diagnose and treatment of diseases,¹¹ consolidating a research area that is rapidly evolving, and produces continuous information in regard to new applications, properties, protocols and results in cellular field.

Stem or progenitor cells

According to its differentiating function, stem cells are classified in embryonic and somatic or adults,¹² although they have received other denominations, so that in pioneer articles the "stem cells" term is found; now, depending on the geographical region where they are being researched and the respective translation, they are called stem, progenitors, "istaminales", precursors or primitive cells.

These two recognized lineages of progenitor cells: a) the pluripotent cells, blastocyst-derived, also called embryonic stem cells (ESC) with capacity to migrate towards the germ line,¹³ and b) multipotent cells, originated from fetal or adult tissues, that have reached a partial differentiation with restricted potentiality, which depends on its evolutionary progress;¹⁴ that is, they can *in vivo* renew and divide to originate more stem cells, or differentiate into defined, specialized and specific lineages.^{7,15}

It is worth mentioning that it is not easy to obtain a significant number of multipotent adult progenitor cells, as consequence of the minimal quantity that can be isolated from tissues, as well as their slow ability to multiply in cultures;¹⁶ they are difficult to grow in laboratory and their proliferation possibility decreases with age,^{14,17} in contrast to embryonic stem cells, that have *in vitro* indefinite reproductive capacity.¹¹ Nevertheless, these multipotent cells present other important functional properties, like persistent implantation in healthy and sick tissues¹⁴ and the capacity of some of them to derive in cells originated

ticas de proliferación y derivación de estas células en las tres capas germinales, con capacidad de mantener su potencial *in vitro*, migrar e integrarse, originando la posibilidad de producir y recuperar tejidos.⁷

Otras células que tienen la capacidad de generar diferentes linajes son las procedentes de teratocarcinoma embrionario (ECC, por sus siglas en inglés, *embryonic carcinoma cells*).⁸ Los teratocarcinomas son tumores gonadales que contienen tejido de las tres capas germinales embrionarias,⁹ útiles como modelos celulares para investigación,^{8,9} pero con desventajas por ser células que presentan aneuploidias; además, los resultados que parecen contundentes *in vitro* pueden no tener la misma respuesta *in vivo*, debido a la redundancia y a las interacciones celulares que no se producen en la caja de cultivo.¹⁰

Mientras la potencialidad y el cariotipo estable de las células madre embrionarias y adultas constituyen un poderoso instrumento, que sumado a la técnica de mutagénesis dirigida permite incursionar desde otra perspectiva en la biología del desarrollo, en la producción animal, en la medicina preventiva y regenerativa, así como en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades,¹¹ consolidando un área de investigación que evoluciona rápidamente, y genera continua información en cuanto a las nuevas aplicaciones, propiedades, protocolos y resultados en el ámbito celular.

Células madre o progenitoras

De acuerdo con su función diferencial, las células madre se clasifican en embrionarias y somáticas o adultas,¹² aunque han recibido otras denominaciones, de tal forma que en los artículos pioneros se encuentra el término *stem cells*; ahora, dependiendo de la región geográfica donde se les investiga y de la respectiva traducción, se les llama células madre, progenitoras, istaminales, precursoras, primitivas o troncales.

Estos dos linajes reconocidos de células progenitoras: a) las células pluripotentes, derivadas del blastocisto, denominadas también células troncoembrionarias (CTE), con capacidad para migrar hacia la línea germinal,¹³ y b) las células multipotentes, provenientes de tejidos adultos o fetales, que han alcanzado una diferenciación parcial con potencialidad restringida, que depende de su progresión evolutiva;¹⁴ es decir, *in vivo* pueden renovarse y dividirse para originar más células troncales, o diferenciarse hacia linajes definidos, especializados y específicos.^{7,15}

Cabe mencionar que obtener un número significativo de células troncales adultas multipotentes no es fácil, como consecuencia de la exigua cantidad que puede aislarse de los tejidos, así como de su lenta habilidad para multiplicarse en cultivo;¹⁶ son difíciles de crecer en el laboratorio y su posibilidad de prolifera-

Cuadro 1

PRINCIPALES TIPOS DE CÉLULAS PROGENITORAS QUE SE HAN AISLADO,
TEJIDOS DE DONDE SE OBTUVIERON Y REFERENCIA

MAIN TYPES OF PROGENITOR CELLS THAT HAVE BEEN ISOLATED,
TISSUES WHERE THEY WERE OBTAINED AND REFERENCE

<i>Tissue</i>	<i>Type of stem cell</i>	<i>Reference</i>
Cardiac	Myocardiocytes	Orlic <i>et al.</i> , 2001 (19)
Brain	Glia	Jiang <i>et al.</i> , 2003 (20)
Blood	Hematopoietics	Passegue <i>et al.</i> , 2002 (21)
Nervous	Glia	Keene <i>et al.</i> , 2000 (22)
Hepatic	Hepatocytes	Korbling <i>et al.</i> , 2002 (23)
Vascular tissue	Endothelium	Jackson <i>et al.</i> , 1999 (24)
Epithelial	Chondrogenics	Kramer <i>et al.</i> , 2000 (25)
Thymus	Epithelial	Gill <i>et al.</i> , 2002 (26)
Bone marrow	Mesenchymals	Koc <i>et al.</i> , 2001 (27)
Pancreas	Langerhans' islets	Choi <i>et al.</i> , 2004 (28)
Embryo	Embryonic stems	Evans <i>et al.</i> , 1981 (10)

from any of the embryonic, mesoderm, ectoderm or endoderm layers.^{16,18}

These qualities have favored research on progenitor cells from epithelial, bone, blood and nervous system, among others, as shown in Table 1.

Embryonic cells

At the moment that the spermatozoon fertilizes the ovum, both pronuclei (one maternal and other paternal) contribute with their genetic information,⁵ they unite to constitute the embryonic genome and syngamy or true fertilization is produced;⁴ immediately mitotic division starts which gives origin to totipotent embryonic stem cells,²⁹ these are blastomeres, that is, in a normal development process, each one divides several times without differentiating, until the morula consolidates, before blastocyst stage.¹

As the cells reproduce and migrate from their original place, they lose totipotent capacity to generate a complete individual²⁸ and turn pluripotent; with an aptitude to produce all types of cells from the organism, they set to form an embryoblast,³⁰ but these stages of *in vivo* potentiality are ephemeral because they rapidly disappear with the growth of the zygotes (Figure 1); gastrula³² process continues and initiates differentiation in the three embryonic germ layers in

ración disminuye con la edad,^{14,17} a diferencia de las células troncoembrionarias, que tienen capacidad de reproducirse indefinidamente *in vitro*.¹¹ Sin embargo, estas células presentan otras importantes propiedades funcionales, como la implantación persistente tanto en tejidos sanos como enfermos¹⁴ y la capacidad de algunas de ellas de derivar a células provenientes de cualquiera de las capas embrionarias, mesodermo, ectodermo o endodermo.^{16,18}

Estas cualidades han favorecido la investigación en las células progenitoras del sistema epitelial, óseo, sanguíneo y nervioso, entre otros, como se muestra en el Cuadro 1.

Células embrionarias

En el momento en que el espermatozoide fertiliza al óvulo, los dos pronúcleos (uno materno y otro paterno) aportan la información de sus genes,⁵ se unen para constituir el genoma embrionario y se produce la syngamia o fertilización verdadera;⁴ de inmediato inicia la división mitótica que da origen a las células madre embrionarias totipotentes,²⁹ éstas son blastómeras, o sea que, en un proceso de desarrollo normal, cada una se divide varias veces sin diferenciarse, hasta que se consolida la mórula, antes del estadio de blastocisto.¹

Conforme las células se reproducen y migran de su

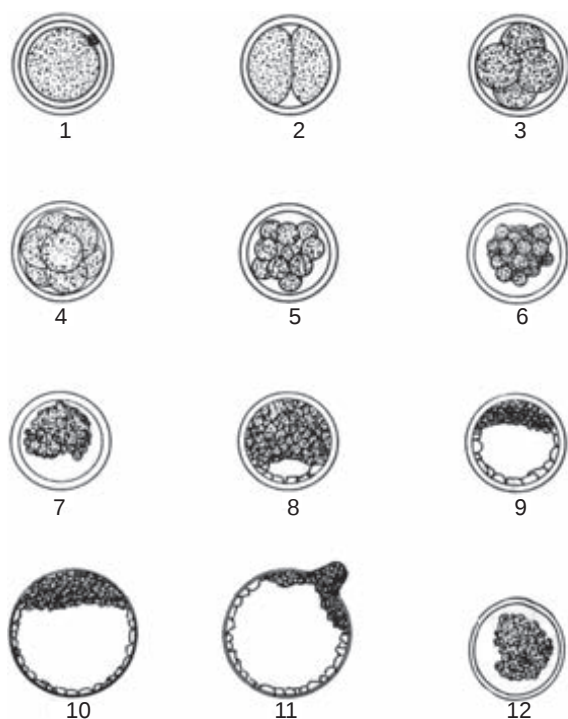
a coordinated way, although asymmetric in magnitude and sense, and asynchronous because each phase, depending on the animal species, varies in time interval;^{2,4} those factors are important for explantation, migration and cell culture.

Based on the aforementioned, embryonic stem cells, from their ontogenic development, initiate an organization pattern of increasing complexity,¹⁶ that by means of the expression of inductor groups leads the undifferentiated original cell, to specialize either in hepatic, neural, epithelial, hematic, etcetera, by the activation of regulatory regions that suggest the existence of “master genes”.^{2,16,33,34}

The embryonic stem cell term was introduced in 1981 by Evans and Kauffman¹⁰ with the purpose to

ubicación original, pierden la capacidad totipotencial de generar un individuo completo²⁹ y se tornan pluripotentes; con aptitud para producir todos los tipos celulares del organismo se abocan a la formación del embrioblasto,³⁰ pero estos estadios de potencialidad *in vivo* son efímeros porque desaparecen rápidamente con el desarrollo del cigoto (Figura 1); continúa el proceso de gástrula³² e inicia la diferenciación en las tres capas germinales embrionarias de manera coordinada, aunque asimétrica en magnitud y sentido, y asincrónica porque cada fase, según la especie animal, varía en intervalo de tiempo;^{2,4} esos factores son importantes para la explantación, migración y el cultivo celular.

Con base en lo anterior, las células madre embrio-



Stage Number*	Description*	Post-estrus days, aprox.*
1*	1 Cell	0-2
2*	2 Cells	1-3
3*	4 Cells	2-3
4*	8 Cells	3-5
5*	16 Cells	4-5
6*-7*	Early and compact process	5-7
8*, 9*, 10*, 11*	Blastocyst stages	8-11
12*	Beginning of gastrulation process: mesoderm differentiation, ectoderm and endoderm	

Figura 1: Representación esquemática de embriones de mamífero (búfalo de agua, *Bubalus bubalis*) primeros estadios de desarrollo celular.³¹

Figure 1: Schematic representation of mammal embryos (water buffalo, *Bubalus bubalis*) first cellular development stages.³¹

distinguish cells originated from healthy zygotes, from those obtained from embryonic carcinomas that already had different cell stratum,⁹ since there are three types of embryonic tissues from where it has been possible to isolate pluripotent cell lines: a) embryonic stem cells from embryonic benignant teratocarcinomas (ECC);⁸ b) healthy embryonic stem cells from blastocysts inner cell mass (ESC);¹⁰ c) primordial germ cells from embryonic germ crests (PGC)^{33,34} (Figure 2).

Non progenitor pluripotent embryonic cells (ECC)

The ECC that propitiated *in vitro* cellular potentiality studies³⁵ are not considered as progenitor cells because they have undergone epigenetic changes that reduce cell response to differentiation and proliferation signals.^{8,35} Nevertheless, these epigenetic changes are stable but reversible and, for that reason, the ECC share morphological, biochemical and immunological properties with the (ES cells), although all the cellular lines derived from teratocarcinomas are characterized for presenting XX karyotype.¹⁰

The embryonic bodies from which ECC are obtained from cell cultures of mouse 129 SvE strains, that have also given origin to normal lines of ESC.⁸

Another way to establish ECC lines consists of the subcutaneous extrauterine injection of ES cells, then surgical recovery of the teratocarcinoma and either cell culturing and *in vitro* differentiation or cell microinjection into blastocysts.^{8,35}

Embryonic stem cells (ES cells)

These cells are derived from the inner cell mass (ICM) of blastocysts or early blastula, during an early

narias, desde su desarrollo ontogénico, inician un patrón de organización de complejidad creciente,¹⁶ que mediante la expresión de un conjunto de inductores lleva a la célula originalmente indiferenciada, a especializarse en hepática, neural, epitelial, etcétera, mediante la activación de regiones regulatorias que sugieren la existencia de "genes maestros".^{2,16,33,34}

El término de célula madre embrionaria fue introducido en 1981 por Evans y Kauffman¹⁰ con el propósito de distinguir las células procedentes de cigotos sanos, de las obtenidas de carcinomas embrionarios con diferentes estratos celulares,⁹ puesto que hay tres tipos de tejidos embrionarios de donde se han podido aislar líneas pluripotentes: a) Teratocarcinomas benignos embrionarios, células troncoembrionarias (ECC);⁸ b) masa celular interna del blastocisto, células troncoembrionarias sanas (CTE);¹⁰ c) crestas germinales embrionarias, células germinales primordiales (CGP)^{33,34} (Figura 2).

Células embrionarias pluripotenciales no progenitoras (ECC)

Las ECC que propiciaron los estudios de potencialidad celular *in vitro*³⁵ no son consideradas como células progenitoras porque han tenido cambios epigenéticos que reducen la eficiencia de respuesta a las señales de diferenciación y proliferación.^{8,35} Sin embargo, estos cambios epigenéticos son estables pero reversibles, y por ello las ECC comparten propiedades morfológicas, bioquímicas e inmunológicas con las CTE, aunque todas las líneas celulares provenientes de teratocarcinoma se caracterizan por tener cariotipo XX.¹⁰

Los cuerpos embrioides de los que se obtienen las ECC provienen de cultivos celulares de las cepas de ratón 129 SvE, que también han dado origen a líneas normales de CTE.⁸

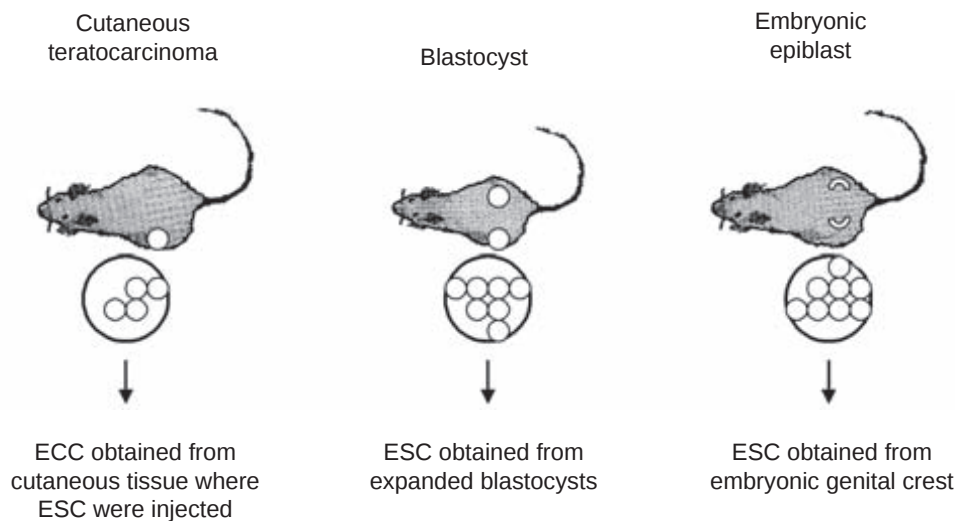


Figura 2: Esquema representativo de la procedencia de los tres tipos de líneas embrionarias de células pluripotentes de ratón.

Figure 2: Representative sketch of the origin of the three types of embryonic lines of mouse pluripotent cells.

embryonic stage of differentiation.. The blastocyst forms under the action of the Oct4 gene and through a mechanism of cell cavitation,^{12,30} forming a sphere with trophoblast cells on the periphery, which give origin to embryonic attachments to the allantoid and the placenta; a central cavity known as blasctoceles; and in a pole of the sphere, the inner cell mass (ICM) or embryoblast formed by pluripotential cells, that have the capacity to give origin to tissues from either of the three embryonic layers, and that is why they were named embryonic stem cells.^{32,36}

Characteristics

Several authors reported that the ES cells are characterized for: a) cells that are derived from multicellular organisms having the natural capacity of diversification in all the cell tissues;² b) they are undifferentiated or not yet specialized;¹⁰ c) all ES cell lines have comparable potentiality;²⁹ d) they are capable of proliferation and self-renewing in *in vitro* culture for a long time without differentiation;⁶ e) they conserve a stable karyotype with no chromosomal aberrations;^{10,29} f) ES cells lines have normal XX or XY karyotype;¹⁰ g) they include two outstanding properties: pluripotentiality and capability to contribute to the germ line chimeras;^{10,29,30} h) they form colonies with a typical ES-cell-like morphology in *in vitro*;^{10,11} i) they have molecular markers as the alkaline phosphatase isoenzyme, a dominium of the Oct4 transcription factor, high telomerase activity, and several membrane markers, as CD34+, that can be marked by monoclonal antibodies;^{13,34} j) they are a valuable instrument for the study and development of new therapeutic methods, since they can be transfected to introduce or interrupt genes taking advantage of the homologous recombination.^{10,11,29,30}

Obtention

In recent protocols, to obtain lines of ES cells emphasis is made in the quality of the culture mediums and meticulous work on embryos in blastocyst stage,¹¹ which, removed from uterine horns of pregnant mice (3.5 days post coitus),²⁹ they are extracted and placed on culture dish with modified Ringer-Krebs solution medium or M2 medium,* which contains NaCl, KCl, CaCl₂, KH₂PO₄, MgSO₄, NaHCO₃, sodium lactate, sodium pyruvate, glucose, bovine serum albumin, penicillin-streptomycin and bi distilled water, plus HEPES buffer.^{29,30}

By the second day of culture *in vitro*, the cells of the internal cellular mass emerge on the plate surface, as consequence of the trophoblast cells migration;¹⁰ nevertheless, the variation among blastocysts is wide

Otra manera de establecer líneas de ECC consiste en la inyección extrauterina subcutánea de CTE, posterior cultivo y diferenciación *in vitro* o introducción en blastocistos.^{8,35}

Células troncoembrionarias (CTE)

Estas células, que también se conocen como células madre troncoembrionarias (ES, por sus siglas en inglés, *embryonic stem*) surgen de la masa celular interna (MCI) del blastocisto o blástula temprana, primero y único evento de diferenciación del cigoto en este estadio embrionario que prosigue a la mórula. El blastocisto se genera bajo la acción del gen Oct4 y del mecanismo de cavitación celular,^{12,30} formándose una esfera que contiene en la periferia las células del trofoblasto, que originan los anexos embrionarios alantoides y placenta; un espacio central denominado blasctoceles; y un polo de la esfera, embrioblasto o MCI formado por células, que tienen la pluripotencialidad de propiciar tejidos de cualquiera de las tres capas embrionarias, por esto se denominan células troncoembrionarias.^{32,36}

Características

Diversos autores notifican que las CTE se caracterizan porque: a) las células que provienen de los organismos multicelulares tienen la capacidad natural de diversificación en todos los linajes celulares;² b) son indiferenciadas o aún no especializadas;¹⁰ c) todas las líneas de CTE tienen potencialidad comparable;²⁹ d) *in vitro* son capaces de dividirse y renovarse, manteniéndose en cultivo durante largo tiempo sin diferenciación;⁶ e) conservan un cariotipo estable y no presentan aberraciones cromosómicas;^{10,29} f) las líneas de CTE tienen cariotipo normal XX o XY,¹⁰ g) incluyen dos notables propiedades: pluripotencialidad y capacidad de contribuir a la línea germinal, cuando se cultivan;^{10,29,30} h) forman colonias que las tipifican morfológicamente en el plato de cultivo;^{10,11} i) tienen marcadores moleculares como la isoenzima de la fosfatasa alcalina, un dominio del factor de transcripción Oct4, alta actividad de la telomerasa, y varios marcadores de membrana, como CD34+, reconocidos por anticuerpos monoclonales;^{13,34} j) son un valioso instrumento para el estudio de nuevas formas de terapia, ya que se pueden transfectar para introducir o interrumpir genes aprovechando la recombinación homóloga.^{10,11,29,30}

Obtención

En los protocolos actuales, para obtener líneas de CTE se enfatiza la calidad de los medios de cultivo

and it is necessary to constantly observe them disperse over NSTO fibroblast monolayers in culture dish.²⁹

They are cultivated during three days post-explantation,^{11,29} in DMEM medium (Dulbecco's modified eagle's medium) or in Whitten's medium**²⁹ with LIF (leukemia inhibitory factor)³⁷ and over feeder cells to which ES cells adhere; if there is proliferation and colonies are formed carrying out several cellular divisions without differentiation, then a stable immortal cellular line can be obtained.²⁹ Figure 3 illustrates the process of ES cells obtainment.

Although embryonic stem cells present morphologic, biochemical and immunologic characteristics, its functionality as pluripotent cells typifies them.³⁰

Isolation

The first studies on isolation, production and management of ES cells were done in mice;¹⁰ since then, many attempts to try to obtain ES cells from several mammals have been made with little success,¹¹ and only human and mouse ES cells have been successfully maintained in culture, in an undifferentiated condition after several passes and after the freezing and thawing process.^{38,39,11} This success could be attributed to the rapid proliferation of ICM in these two species, in contrast with other species whose ICMs forms a mitotic disc;³² and to the short lapse in number of (few hours) occurring between blastocyst stage and the beginning of the delamination of the primary endoderm.^{30,32,40}

The pluripotent cell lines with normal karyotype can reproduce *in vitro*, without differentiation during culture, in presence of LIF³⁷ and one layer of fibroblasts as feeder cells, where they grow rapidly,²⁹ and are able to accept exogenous genetic material by transfection and can later be induce to differentiation, if

y la minuciosidad para trabajar los embriones en estado de blastocisto,¹¹ que, removidos de los cuernos uterinos de ratonas gestantes (3.5 días poscoito),²⁹ se extraen y se colocan en caja de cultivo con medio modificado de solución Ringer-Krebs,* compuesto por NaCl, KCl, CaCl₂, KH₂PO₄, MgSO₄, NaHCO₃, lactato de sodio, piruvato de sodio, glucosa, albúmina de suero bovino, penicilina-estreptomicina y agua bides-tilada, más HEPES tampón.^{29,30}

Al segundo día *in vitro*, las células de la masa celular interna emergen a la superficie del plato, por migración del trofoblasto;¹⁰ sin embargo, la variación entre blastocistos es amplia y es necesario vigilarlos constantemente para hacer la disgregación sobre monocapa de fibroblastos NSTO en la caja de cultivo.²⁹

Se siembran en placa durante tres días posexplan-tación,^{11,29} en medio DMEM (*Dulbecco's modified eagle's medium*) o en medio Whitten's**²⁹ con LIF (*leukemia inhibitory factor*)³⁷ y sobre células nodrizas a las cuales se adhieren las CTE; si hay proliferación y se forman colonias que llevan a cabo varios ciclos de división celular sin diferenciarse, entonces se puede obtener una línea celular inmortal estable.²⁹ La Figura 3 recrea el procedimiento de obtención de CTE.

Estas líneas han recibido diferentes denomina-ciones: células madre embrionarias pluripotenciales, del tallo embrionario o células troncoembrionarias, y aunque presentan características morfológicas, bio-químicas e inmunológicas, su funcionalidad como células pluripotentes las tipifica.³⁰

Aislamiento

Los primeros estudios sobre aislamiento, producción y manejo de CTE se realizaron en ratones,¹⁰ desde

* M2, Sigma 5910, Estados Unidos de América.

**Sigma M1285, Estados Unidos de América.

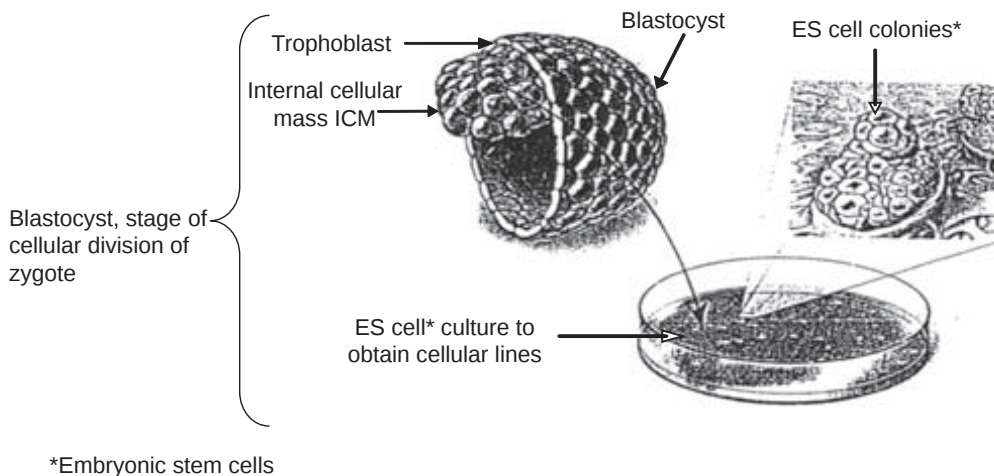


Figura 3: Esquema de la extracción y cultivo de células troncoembrionarias obtenidas de la masa celular interna del blastocisto.³⁰

Figure 3: Sketch of the extraction and culture of embryonic stem cells obtained from internal cellular mass of the blastocyst.³⁰

culture in absence of feeders, allowing the aggregate formation^{6,29,34} (Figure 4).

Research has proven that if these aggregates adhere to the dish surface, cells will proliferate and grow out of the aggregates, potentiating spontaneous differentiation into muscular, neural, glandular epithelial and other cell lineages;^{39,41} and if the aggregates are kept in suspension, they form embryonic bodies equivalent to the visceral vitelline sack, or form mesoderm derivatives as cardiac muscle.^{32,34,40}

Use

The ES cells are an invaluable biological tool that allows to perform *in vitro* and *in situ* studies, and at the same time, observe and analyze *in vivo* and *in vitro* results,^{29,30} this way, a new paradigm has been generated in applied and basic research,^{11,30,39} in which the interdisciplinary relation –biochemistry, molecular and cellular biology, genetics, bio-informatics and the new bio-engineering–,^{6,21} offers a significant contribution to the understanding of regulation of the cell cycle, as well as the study of ligand-receptors, development processes and bio-technology research, modification of animal genome, whether in the protein expression pattern, over-expression and loss or gain of function.^{11,14}

Use of ES cells for gene targeting

Gene targeting is a technique that allows the introduc-

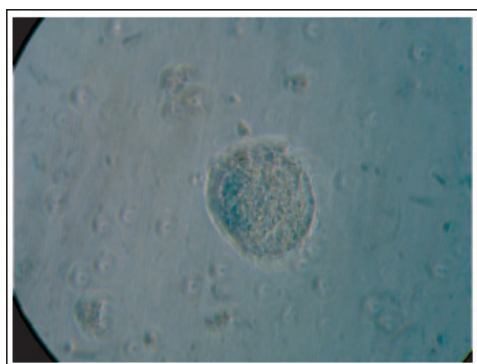
entonces se han tratado de aislar CTE de muchas especies de mamíferos con poco éxito,¹¹ sólo se han logrado mantener en cultivo, indiferenciadas por varios pasajes y en congelación, CTE humanas y de ratón,^{38,39,11} esto último se atribuye a la rápida proliferación de la MCI en estas dos especies, a diferencia de otras en las cuales la MCI forma un disco mitótico aquiescente;³² además del tiempo –en número de horas–, que hay entre la fase de blastocisto y el inicio de la delaminación del endodermo primario.^{30,32,40}

Las líneas celulares pluripotentes con cariotipo normal se pueden multiplicar *in vitro*, sin diferenciación durante el cultivo, en presencia de LIF³⁷ y de una monocapa de fibroblastos como células alimentadoras, donde crecen rápidamente,²⁹ aceptan material genético exógeno por transfección y luego se induce su diferenciación, si se cultivan en ausencia de la monocapa, permitiendo la formación de agregados^{6,29,34} (Figura 4).

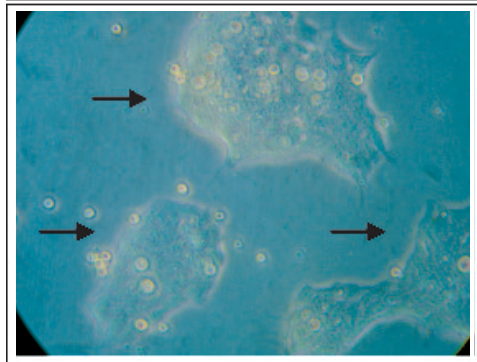
Continuas investigaciones han probado que si los agregados se adhieren al plato, las células proliferan y salen de los agregados, potenciando su diferenciación espontánea a linaje muscular, neural, glandular, epitelial u otros;^{39,41} y si los agregados se mantienen en suspensión, forman cuerpos embrioides equivalentes al saco vitelino visceral, o forman derivados del mesodermo como músculo cardíaco.^{32,34,40}

Usos

Las CTE son una invaluable herramienta biológica



A) Colony of embrionic stem cells E14TG2a of mouse, four days in culture, 40X objective, inverted microscope Leica trademark. Arrow shows colony without stain.



B) Colonies of embrionic stem cells E14G2a of mouse, seven days in culture, 40X objective, inverted microscope Leica trademark. Arrows indicate colonies without stain.

Figura 4: Fotografías en microscopio invertido (40X) del cultivo de células tronco-embrionarias de ratón cepa E14, pasaje 12 (Fotografías tomadas en el Laboratorio de Cultivo Celular del CIESA de la FMVZ de la UAEM).

Figure 4: Photographs in inverted microscope (40X) of embryonic stem cells of mouse E14 strain's culture, pass 12. (Photographs taken at the Cellular Culture Laboratory of the Center of Research and Advanced Studies in Animal Health [CIESA] of the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry [FMVZ] of the Autonomous University of the State of Mexico [UAEM]).

tion of specific genetic modifications in the genome of an organism, by means of a mechanism for DNA repair called homologous recombination;¹¹ it starts with the construction of a transgene that carries a fragment of DNA with the sequence of the gene of interest, isolated from an organism or designed in the laboratory, with the specific purpose of making changes in a predetermined place of a chromosome.⁴²

Introducing by transfection this transgene in the embryonic stem cell's genome together with homology sequence of the endogenous DNA of one specific gene and markers of selection, the possibility of recombination and detecting a transgene is increased.^{42,43} If gene targeting is achieved, embryonic stem cells can then be incorporated in recipient blastocyst by aggregation or microinjection,²⁹ which can be transfer to pseudo-pregnant females.^{11,29} It is necessary that the construction has been permanently integrated and that the ES cells go to germ line; that is, that the transgene is also found in germ cells in the gonads of the chimeric animal so that the transgene is inherited.⁴²

This methodology is used to produce animal models that have helped to study metabolic routes (for example, dopaminergics signalization via)⁶⁶ for the production of recombinant proteins (insulin, lactoferrin, alpha-anti-trypsin)¹¹ to study the precise site or way an enzymatic group acts (TGF β),⁶⁴ or the site and pathogenesis of a disease (Parkinson, Alzheimer, diabetes, among others).^{11,43}

ES cells for transgenic animal production

A transgenic organism is one who carries exogenous DNA fragments in its genome and transmits these modifications to their descendants through their gametes.⁴⁴ There are different systems to generate gene targeted transgenic animals. With the use of the ES cells technique transfected with exogenous DNA, reintroduced to receptor blastocysts, it will be managed that they incorporate to the ICM of the receptor and continue their development. In this context, those *in vivo* will maintain their capacity to generate different cellular types of the organism, for they progressively differentiate during the organism intrauterine phase.⁴²

It is important to highlight that no embryonic stem cell lines of domestic animals have been produced yet from domestic animals,⁴⁵ since the ICM cells obtained from these species do not remain undifferentiated when they are reproduced *in vitro*,⁴⁵ for this reason, gene targeted transgenic farm animals that actually produce recombinant proteins in milk, have been obtained, but by means of gene targeting in multipotent adult progenitor cells, technique that takes advantage of the natural phenomenon of homologous

que permite realizar estudios *in vitro* e *in situ*, y, a su vez, observar y analizar resultados *in vitro* e *in vivo*;^{29,30} de esa manera, se genera un nuevo paradigma en investigación básica y aplicada,^{11,30,39} en el que la relación interdisciplinaria –bioquímica, biología molecular y celular, genética, bioinformática y las nuevas bioingenierías–,^{6,21} permite un significativo aporte a la regulación del ciclo celular, así como el estudio de receptores-ligandos, procesos del desarrollo, y en investigación biotecnológica, modificación del genoma animal, ya sea en el patrón de expresión de proteínas, la sobreexpresión y la pérdida o ganancia de función.^{11,14}

Uso de las CTE para mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida constituye un procedimiento que permite introducir modificaciones genéticas específicas en el genoma de un organismo, mediante el mecanismo de recombinación homóloga para reparación del ADN;¹¹ se inicia con la construcción de un vector transgénico que porta un fragmento de ADN del gen que interesa estudiar, aislado de un organismo o diseñado en el laboratorio, con el propósito específico de efectuar cambios en un sitio determinado de un cromosoma.⁴²

Al introducir este transgene en el genoma de la célula troncoembrionaria junto con una secuencia de homología del ADN endógeno y de marcadores de selección, se incrementa la posibilidad de recombinación y de detectar al transgene.^{42,43} Si se consigue que mediante mutagénesis dirigida este último se incorpore espacial y temporalmente en las células troncoembrionarias por agregación o por microinyección, éstas se introducirán en blastocistos receptores²⁹ y se transferirán a hembras pseudopreñadas.^{11,29} Es necesario que la construcción se haya integrado permanentemente; es decir, que el transgene también se encuentre en las células gonadales del animal que se ha producido y que sea heredable.⁴²

Esta metodología se utiliza para la generación de modelos animales que permiten conocer las vías metabólicas (por ejemplo, vía de señalización de dopaminérgicos)⁶⁶ para la producción de proteínas recombinantes (insulina, lactoferrina, alfa-antitripsina),¹¹ de manera que se conozca el sitio preciso o la forma en que actúa un grupo enzimático (expresión de TGF β),⁶⁴ o el sitio y mecanismo de ataque de una enfermedad (Parkinson, Alzheimer, diabetes, entre otras).^{11,43}

Usos de las CTE para la producción de transgénicos

Un organismo transgénico es el que lleva en su

recombination to the endogenous gene, functional part of the exogenous gene in question, all this is limited by the restriction sites that allow alignment with the specific endogenous gene fragment (that produce a "specific-tissue" protein, for instance lactalbumin). The nuclei of the genetically modified cells are microinjected to enucleated oocytes⁴⁶ that are transplanted into recipient females; when these offspring come to an adult stage they express *in vivo* the aggregated characteristics.

In this manner, using "tissue-specific" gene promoters and the enzymatic machinery of tissues (udder, blood vessels, kidney, sweat glands, lachrymal glands) of the animals, the interference of the transgene is avoided with the female or male metabolism that presented a change in its genic sequence, whether it be the introduction or suppression of the gene; the inactivity or function change; the production of a fusion protein or a drug, with genome modification.^{11,44}

Primordial germ cells

The primordial germ cells (PGC) represent the progenitor cells of gametes from animals; depending on the species, derive from the wall of the endoderm of the vitelline sack, near the allantois,^{32,36} or a small cellular population of the embryonic epiblast in the mice case;^{33,47} they stay there until they receive the migration signal to the gonadal crests.⁴⁸

The PGC gonadal precursors have been isolated from the germ crest of mouse fetuses,³³ towards half of the gastrula stage in the pre-implantation phase, where they are still pluripotent and, maintain their differentiation capacity to all cell lines.⁴⁸ They behave as ES cells lines and possess great capacity of *in vitro* proliferation.^{33,34}

In culture conditions, the PGC are only viable 30 to 40 passages, but they have the advantage of not forming teratomas when they are injected in mice; therefore, they can represent a safe source of cells for transfection and transplantation results.^{29,33}

Another important factor in the PGC constitutes the potential that represents the presence of homeobox (conserved sequences of 180 base pairs, present in the genes involved in the development of a wide range of organisms) and of transcription factors as Oct4, also present in ES cells, but not in other type of developing fetal cells.^{15,34,48}

Although research of cellular lineages obtained from PGC of domestic animals continue, it has not been proven that these contribute in the successive germ line of species other than mouse.^{42,44}

genoma fragmentos de ADN exógeno y que transmite esas modificaciones a sus descendientes por vía germinal.⁴⁴ Existen diferentes sistemas para generar animales transgénicos. Con el uso de la técnica de CTE transfectadas con ADN exógeno, reintroducidas a blastocistos receptores, se logrará que se incorporen a la MCI del receptor y continúen su desarrollo. En este contexto, aquéllas mantendrán *in vivo* su capacidad para generar los distintos tipos celulares del organismo, pues se diferenciarán progresivamente durante la fase intrauterina del organismo.⁴²

Es importante destacar que aún no se han producido líneas celulares troncoembrionarias de animales domésticos,⁴⁵ ya que los aislamientos de MCI que se han logrado de estas especies no mantienen sus características cuando se multiplican *in vitro*,⁴⁵ por esta razón los animales transgénicos de granja que actualmente producen proteínas recombinantes en la leche, se han logrado, pero mediante mutagénesis dirigida en células somáticas, técnica que aprovecha el fenómeno natural de la recombinación homóloga al gen endógeno, la parte funcional del gen exógeno de interés, todo esto flanqueado por los sitios de restricción que permiten la alineación con el fragmento del gen endógeno específico (que producen una proteína "tejido-específica", por ejemplo, lactalbumina). Posteriormente, los núcleos que han adquirido el transgene son microinyectados a ovocitos enucleados⁴⁶ que se implantan en hembras nodrizas; cuando estas crías llegan a su etapa adulta, son inducidas para expresar *in vivo* las características agregadas.

De esta manera, utilizando los promotores de genes "tejido-específico" y la maquinaria enzimática de los tejidos y secreciones (ubres, vasos sanguíneos, riñón, glándulas sudoríparas, glándulas lagrimales, leche) de los animales, se evita la interferencia del transgen con el metabolismo de la hembra o macho que tuvo un cambio en su secuencia génica, ya sea la introducción o supresión del gen; la inactividad o cambio de función, la producción de una proteína de fusión o un fármaco, con modificación del genoma.^{11,44}

Células madre germinales primordiales

Las células madre germinales primordiales (CGP) representan las células progenitoras de los gametos de los animales en desarrollo; según la especie, derivan del endodermo de la pared del saco vitelino, cerca de la alantoides,^{32,36} o de una pequeña población celular del epiblasto embrionario para el caso de los ratones;^{33,47} permanecen ahí hasta que reciben la señal de migrar a las crestas gonadales.⁴⁸

Las CGP precursoras de las gónadas se han aislado a partir de la cresta germinal de fetos de ratón,³³ hacia la mitad del estadio de gástrula en la fase de preim-

Multipotent adult progenitor cells

In mammals, after birth and until maturity, the organism keeps a small cell reserve in some organs and tissues, capable of renewing or repairing them; these are differentiated quiescence cells,⁷ immature, non primitive and, once derived from the early embryo, they become specialized through the individual's life, in supplying maintenance cells for the organism; they are called multipotent adult progenitor cells.¹⁴

According to the aforementioned, for a cell population to be considered stem or progenitor it must have the following characteristics: *a)* give rise to several cellular types, without losing its generic state of potentiality; *b)* must divide and originate more progenitor cells or differentiate into determined cell lineages; *c)* they must have auto-renewing capacity; *d)* adhesion and migration capacity; *e)* persistent implantation capacities in healthy and sick tissues; *f)* they must be maintained in culture during several divisions without chromosomal abnormalities.^{49,50}

Epithelial progenitor cells

There are embryonic development reminiscent processes that take place in adult multicellular organisms which are necessary for self maintenance and repair, for example permanent epithelial renewal;^{2,51} however, alterations in these processes may induce tumors development.^{4,52}

It is important to consider that, while repair and regeneration potentiality of the progenitor cells, like the one occurring in the pigmentary cells of the ocular retina,⁴⁰ the human liver which has the capacity to regenerate up to 50% of its mass and bone marrow where the 350 million erythrocytes are replaced every minute,³⁶ in other organs where stem cells also exist this process is uncommon.^{53,54}

In contrast, it has been found that some progenitor cells are able to cross the germinal cell layers' barrier, this is attributed to the cellular transdifferentiation and redetermination,^{14,15,38} such processes somehow explain the regeneration of extremities and complex tissues, considered as the particular propriety of some vertebrates, as the salamanders.⁵

In epithelial research, it was observed that the perforation in the mouse ear rarely follows a complete regeneration process, and instead, follows a reparation process.²³

Nevertheless, in a work with transgenic mice expressing the E6 and E7 oncogenes of the human papilloma virus in stratified epithelia, an increment was observed in the proliferative capacity (maybe from the epidermis stem cells), that increased the regeneration capacity in such a degree that the auricle was

plantación, donde aún son pluripotentes, mantienen su capacidad de diferenciación a todas las líneas celulares,⁴⁸ se comportan como líneas celulares de CTE y poseen gran capacidad de proliferación *in vitro*.^{33,34}

En condiciones de cultivo, las CGP se mantienen viables sólo de 30 a 40 pases, pero tienen la ventaja de no formar teratomas cuando se inyectan en ratones, por ello pueden representar una fuente más segura para los resultados de transfección y trasplantes.^{29,33}

Otro factor importante en las CGP lo constituye el potencial que representa la presencia de los homeobox (secuencias conservadas de 180 pares de bases, presentes en los genes involucrados en el desarrollo de un amplio rango de organismos) y de factores de transcripción como Oct4, también presente en CTE, pero no en otros tipos de células del feto en desarrollo.^{15,34,48}

Aunque las investigaciones de los linajes celulares obtenidos de las CGP de animales domésticos continúan, no se ha verificado que éstas contribuyan en la línea germinal sucesiva de especies diferentes a los murinos.^{42,44}

Células progenitoras adultas o somáticas multipotentes

En los mamíferos, después del nacimiento y hasta la madurez, el organismo mantiene una pequeña reserva de células en algunos órganos y tejidos, capaces de renovarlos o repararlos; éstas son células diferenciadas quiescentes,⁷ inmaduras, no primitivas y, una vez derivadas del embrión temprano a lo largo de la vida del individuo, se especializan en suministrar células de mantenimiento para el organismo; se denominan células progenitoras multipotentes (MAPC, *multipotential adult progenitor cells*) o células somáticas troncales.¹⁴

De acuerdo con lo anterior, para que una población celular sea considerada troncal o progenitora debe reunir las siguientes características: *a)* dar origen a varios tipos celulares, sin perder su estado genérico de potencialidad; *b)* deben dividirse y originar más células progenitoras o diferenciarse hacia linajes o estirpes celulares determinadas; *c)* deben tener capacidad de autorrenovación; *d)* capacidad de adhesión y migración; *e)* capacidades de implantación persistente tanto en tejidos sanos como enfermos; *f)* deben mantenerse en cultivo durante varias divisiones celulares sin anomalías cromosómicas.^{49,50}

Células progenitoras epiteliales

En los organismos multicelulares adultos ocurren procesos reminiscentes del desarrollo embrionario que son necesarios para mantener al organismo fun-

regenerated, including the cartilage and skin, leaving almost no signs of damage.⁴⁹

Osteoprogenitor cells

The extremities are the classic biological model to study morphogenetic processes; osteoprogenitor cells are located in the endosteum and in the internal cellular layer of the periosteum, where they cover the haversian canals;⁴⁰ they are elongated, with a small cytoplasm. They arise from primitive mesenchymal cells and form a population of stem cells capable of dividing and give rise to cells that will differentiate into osteoblasts.⁵⁵

These cells are derived from mesenchyma (mesoderm), proliferates by mitosis and have the potential to differentiate into osteoblasts (bone) and in low oxygen conditions can also differentiate into chondrogenic cells (cartilage).^{56,57}

Mesenchymal and stroma stem cells are also found in the bone marrow and they produce adipocytes and osteoblasts that can be precursors of multipotent adult progenitor cells (MAPC) (Figure 5).

Usefulness of osteoprogenitor cells' culture

Approximately, one in every 10 000 cells in bone marrow corresponds to an osteoprogenitor;²⁷ for this reason, they are difficult to locate; nevertheless, they constitute a field of research on: *a) in vitro* cultures of bone cells (osteoblasts) with their osteoinduction characteristics, and biocompatibility;²⁷ *b)* generation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2), useful for reconstructing large bone segments; *c)* generation of demineralized bone to freeze, that diminishes the immune response but favors osteoinduction;⁵⁵ *d)* autologous spongy bone generation, it is considered the ideal graft, because it supplies osteoprogenitor cells (osteoblasts) with adequate biomechanical properties, despite its limited availability; *e)* generation of cytokines (IL-1, IL-6) produced by osteoblasts which participate in bone formation and resorption; and cytokines produced by osteoclasts (TNF- α , IL-1b, IFN- γ and annexin II), that maintain normal hematopoiesis and immune response.⁵⁵

The osteoprogenitor cells respond to localization signals insuline-like growth factors (IGF I and II) that stimulates cell proliferation, the transforming growth factor (TGF- β), which, at the same time, acts as regulator of the fibroblastic growth factor (FGF α) of the germ cells-derived growth factor (PDGF) and the bone morphogenetic factor (BMP); these polypeptide super-families intervene in the development, in the homeostasis of adult tissues and are potential formers of bone.⁵⁸

cional y repararlo cuando hay daño; es el caso de la renovación epitelial permanente;^{2,51} sin embargo, las alteraciones en estos procesos pueden conducir a la aparición de tumores.^{4,52}

Es de notar que mientras el potencial de reparación y regeneración de las células progenitoras, como las pigmentarias de la retina del ojo,⁴⁰ las células del hígado humano que tienen capacidad para regenerar hasta 50% de su masa y los 350 millones de eritrocitos que se reemplazan por minuto,³⁶ en otros órganos donde también existen células madre este proceso no es común.^{53,54}

En contraparte, se ha hallado que algunas células pueden atravesar la barrera de las capas germinales, esto se atribuye a la transdiferenciación y redeterminación celular;^{14,15,38} dichos procesos explican, en parte, la regeneración de extremidades y tejidos complejos, considerada como propiedad particular de algunos vertebrados, como las salamandras.⁵

En investigaciones acerca del epitelio, se observó que una perforación de la oreja del ratón rara vez lleva a cabo un proceso de regeneración completo, más bien ocurre un proceso de reparación.²³

Sin embargo, en un trabajo con ratones transgénicos que expresan los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano en epitelios estratificados, se observó que un aumento en la capacidad proliferativa (quizá de las células troncales de la epidermis), incrementó la capacidad de regeneración a tal grado que la oreja pudo formar todos sus componentes, incluyendo el cartílago, sin dejar casi rastros del daño provocado.⁴⁹

Células osteoprogenitoras

Las extremidades son el modelo biológico clásico para estudiar procesos morfogenéticos; en ellas se encuentran las células osteoprogenitoras localizadas en el endostio y en la capa celular interna del periostio, recubren los canales haversianos;⁴⁰ son alargadas, con citoplasma poco prominente, proceden de las células mesenquimáticas primitivas y forman una población de células troncales capaces de dividirse y dar origen a células que se diferencian a osteoblastos.⁵⁵

Como derivan del mesénquima embrionario (mesodermo que migra), pueden dividirse por mitosis y tienen el potencial de diferenciarse en osteoblastos (hueso) y en condiciones de tensión baja de oxígeno pueden diferenciarse como células condrogénicas (cartílago).^{56,57}

En la médula ósea también se hallan las células madre mesenquimáticas y del estroma que producen adipositos y osteoblastos que pueden ser precursoras de las células progenitoras adultas multipotentes (MAPC) (Figura 5).

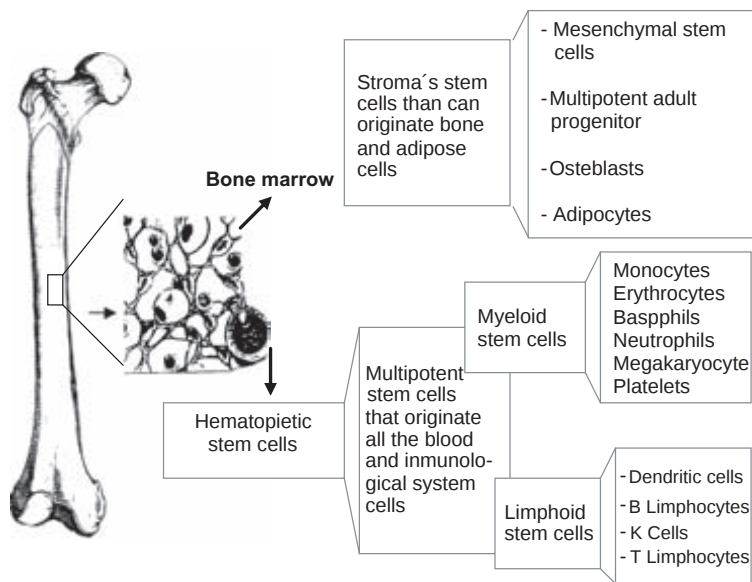


Figura 5: Diagrama del origen y reservorio de las células madre hematopoyéticas y del estroma en los mamíferos.¹⁶

Figure 5: Diagram of the origin and reservoir of hematopoietic stem cells and stroma in mammals.¹⁶

Although the general role of these molecular series is known, their specific role on bone remodeling and their capacity to increase mineral density is unknown. Besides, they can originate neoplasms if they lose control and the information is not on time.²³

Blood progenitor cells

Hematopoietic progenitor cells (HSC; hematopoietic stem cells) generate all types of blood cells; they are found in bone marrow –although in fetal stage they are found in liver and spleen–,⁴ they have the ability to produce all the cells that form blood: erythrocytes, leukocytes and platelets and others within the same tissue; although recently, it was achieved to generate these cells from other lineages, for this reason they are cataloged as progenitor cells.^{14,23}

It was initially thought that hematopoietic cells, for their natural multipotentiality, were the only progenitor cells in the bone marrow with capacity to generate different types of cells; however, it has been shown that bone marrow is more complex, for another heterogeneous group of adult stem cells has been identified, called mesenchymal or stromal cells, cataloged as multipotent adult progenitor cells.^{21,59}

A key factor in the hematopoietic tissue is the volume and morphology of progenitor cells, besides being scarce, they can easily be mistaken for leukocytes for their morphologic likeness.²⁶

In a study on bone marrow transplants,^{60,61} donor cells were found in different receptor tissues and it was concluded that by appropriate conditions, progenitor cells of bone marrow contribute to the regeneration of many tissues of the organism, these same characteristics are attributed to fetal stem cells from the umbilical cord blood.⁶²

Utilidad del cultivo de las células osteoprogenitoras

En la médula ósea de los mamíferos por cada 10 000 células aproximadamente, sólo una corresponde a osteoprogenitora,²⁷ por ello es difícil e impredecible su localización; sin embargo, su estudio constituye un campo de investigación en: a) Cultivos *in vitro* de células óseas (osteoblastos) con sus características de osteoinducción y biocompatibilidad;²⁷ b) generación de proteína morfogenética recombinante humana-2 (rhMBP-2), útil para reconstruir grandes segmentos de hueso; c) generación de hueso desmineralizado para congelar, que disminuye la respuesta inmune pero favorece la osteoinducción;⁵⁵ d) generación de hueso esponjoso autólogo, se considera el injerto ideal, pues proporciona células osteoprogenitoras (osteoblastos) con propiedades biomecánicas adecuadas, no obstante su limitada disponibilidad; e) generación de citocinas producidas por osteoblastos interleucinas 1 y 6 (IL-1, IL-6) que participan en la formación y resorción ósea; y citocinas producidas por osteoclastos (TNF- α , IL-1b, IFN- γ y anexina II), que mantienen la hematopoyesis y respuesta inmune normales.⁵⁵

Las células osteoprogenitoras acuden a las señales de ubicación del factor de crecimiento similar a insulina (IGF I y II) que estimula la proliferación celular y el factor de crecimiento transformante (TGF- β), que, a su vez, actúa como regulador del factor de crecimiento fibroblástico (FGF $\alpha\beta$) del factor de crecimiento derivado de células germinales (PDGF) y del factor morfogenético de hueso (BMP); estas superfamilias de polipéptidos intervienen en el desarrollo, en la homeostasis de los tejidos adultos y son formadores potenciales de hueso.⁵⁸

Se sabe de estas series moleculares, pero se des-

Hematopoietic progenitor cells of the umbilical cord

Many of the progenitor cells that circulate in fetuses' blood, remain in the umbilical cord and placenta at birth,⁶³ umbilical cord blood carries, among other components, erythrocytes and an immature group of leukocytes (macrophages, lymphocytes and neutrophils) that have surface recognition proteins and form part of the immunological system.⁴⁰

This property of immaturity of the immune system takes advantage to collect cells that assist in the treatment of diseases that require blood cell transplants;⁶³ because since a decade ago, only the progenitor cells preceding from a highly compatible donor could help to correct deficiencies in the blood system of an individual; otherwise, the possibility of this to develop graft vs host disease was very high.²³

Like the human leukocytes associated antigen (HLA), the donor and receptor patients involved in the transplants must be very similar, the use of umbilical cord blood reduces the risk of rejection if a tissue containing minimum three HLA similar to those of the receptor is used.²¹

The HLA belongs to an histocompatibility antigen family, genetically codified by the major histocompatibility complex (MHC), and are expressed in any nucleated cell of the body, and if the immune system does not recognize the protein as their own or the HLA antigen of any cell, they destroy it.²³

Since the cells of umbilical cord blood do not express the HLA in full, when it is use for a transplant, the probability of rejection decreases and the success of treatment for genetic diseases and some types of leukemia improves.⁶³

Neural progenitor cells

From the embryonic stem cell lines that maintain the potential to differentiate into all cellular types of the adult organism and the ones produced as development advances, other lineage of stem cells more compromised with certain tissues arise, that will propitiate specific tissue cells,⁶⁴ neural precursor cells, able to differentiate into main cellular types of the central nervous system: neurons, astrocytes and oligodendrocytes.²⁰

Several research groups have cultivated cells that, *in vitro* behave as neural stem cells; nevertheless, their real potential of differentiation has been difficult to establish, since the molecules that promote specific differentiation are still unknown.^{65,66}

In some cases it has been found that cellular identity patterns do not correspond to the tissues of origin.⁶⁷ To evaluate stem cells potential, and particu-

lamente su papel específico en la remodelación ósea y su capacidad para incrementar la densidad mineral. Además, pueden llegar a formar neoplasias si se pierde el control y la información no llega oportunamente.²³

Células progenitoras sanguíneas

Las células progenitoras hematopoyéticas (HSC; *hematopoietic stem cells*) generan todos los tipos de células sanguíneas y del sistema inmune; se hallan en la médula ósea —aunque en la fase fetal se encuentran en el hígado y en el bazo—,⁴ conservan la capacidad de producir todas las células que forman el tejido vascular: eritrocitos, leucocitos, plaquetas y otras dentro del mismo tejido; aunque recientemente se logró generar a partir de estas células otros linajes, por ello se catalogan como células progenitoras.^{14,23}

Así, las células hematopoyéticas, por su multipotencialidad natural, se consideraban como las únicas en la médula ósea con capacidad para generar diferentes tipos celulares; pero se ha mostrado que la composición de la médula ósea es más compleja, pues en ella se ha identificado otro grupo heterogéneo de células madre adultas, denominadas células mesenquimales o estromales, catalogadas como progenitoras adultas multipotentes.^{21,59}

Un factor clave en el tejido hematopoyético es el volumen y la morfología de células progenitoras, pues además de ser escasas, por su parecido morfológico pueden confundirse fácilmente con los leucocitos.²⁶

En un estudio sobre trasplantes de médula ósea,^{60,61} se encontraron células del donante en diferentes tejidos del receptor y se concluyó que bajo condiciones apropiadas, las células progenitoras de la médula ósea contribuyen en la regeneración de muchos tejidos del organismo, estas mismas características se atribuyen a las células madre fetales de la sangre del cordón umbilical.⁶²

Células progenitoras hematopoyéticas del cordón umbilical

De las células progenitoras que circulan por la sangre de los neonatos, muchas quedan en el cordón umbilical y la placenta,⁶³ la sangre del cordón lleva, entre otros componentes, eritrocitos y un grupo inmaduro de leucocitos (macrófagos, linfocitos y neutrófilos) que tienen en la superficie proteínas de reconocimiento y forman parte del sistema inmunológico.⁴⁰

Esta propiedad de inmadurez del sistema inmune se aprovecha para recolectar células que coadyuvan al tratamiento de enfermedades que requieren trasplante de células sanguíneas,⁶³ porque hasta hace una década sólo las células progenitoras provenientes de

larly of neuronal precursors in mammals, an implantation system of *in vitro* cells was designed which allows evaluation of potential differentiation of neural stem cells, without knowledge of the specific molecules involved in the surrounding.^{67,68}

In this system it has been shown that the neurospheres, one of the most frequent ways the neural stem cells grow, are mainly formed by cells that will not give rise to neurons in natural differentiation environments.²⁰ However, adult-derived embryonic stem cells and stem cells can give rise to neurons in this differentiation environment.^{66,67}

Activation, regulation and identification of ES cells and MAPC

Each eukaryotic cell expresses and utilizes information corresponding to its function, but they also have stored information about how some other cells of the organism should work, are constituted, and how the other organism cells from which they belong to should function,^{3,7} since all the cells of an organism are derived from an initial cell, the unicellular embryo or zygote that successively divides, giving rise to daughter cells, making in each division identical copies of its DNA, that contains the information of the individual as a whole; temporarily and spatially activating and deactivating the regulation and control mechanisms that correspond to each cellular lineage.^{7,14}

Internal mechanisms of control

Internal mechanisms of cells determine the number of times they must divide before becoming completely differentiated; a complex group of short and long range between cells, their pluripotent daughters and neighbor cells controls, activation and regulation³⁰ for stage changes from morula to blastula, to gastrula and the successive, coadjuvanted by cytokines, proteins that direct cellular maturation;³ promoter and inhibitor proteins of the cell cycle such as mitosis promoter factors, conformed by cyclins and kinases dependent on cyclin CDK2; cellular interactions with the extracellular matrix through membrane receptors such as integrins³ and by genetic factors. At the first cell differentiation that generates the blastula, the nanog gene intervenes, which only activates in the ES cells; it has been demonstrated that its nullification leads to unspecified blastocyst pluripotent cells.³⁸

External mechanisms of control

When the external signals that reach the membrane receptors are transduced inside the cell by a series of biochemical reactions of phosphorylation and dephos-

un donador altamente compatible con el receptor podían ayudar a corregir deficiencias en el sistema sanguíneo de un individuo; de otra forma, la posibilidad de que éste desarrollara la enfermedad injerto contra portador era muy alta.²³

Como los antígenos leucocitarios asociados (HLA, *human leukocytes associated antigen*) de donador y receptor involucrados en los trasplantes deben ser muy parecidos, el uso de sangre de cordón umbilical reduce el riesgo de rechazo si se utiliza tejido que contenga como mínimo tres HLA similares a los del receptor.²¹

Debido a que los HLA son una familia de antígenos de histocompatibilidad, codificados genéticamente por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*), se expresan en cualquier célula nucleada del cuerpo, y como forman parte del sistema inmune, si no reconocen como suya la proteína o el antígeno HLA de cualquier célula, la destruyen.²³

Si la sangre del cordón umbilical no ha desarrollado este sistema, cuando se usa para un trasplante, la probabilidad de rechazo disminuye y da oportunidad para el tratamiento de enfermedades genéticas y algunos tipos de leucemias.⁶³

Células progenitoras neurales

De las líneas celulares troncales embrionarias que mantienen el potencial para diferenciar hacia todos los tipos celulares del organismo adulto y de las que se producen conforme avanza el desarrollo, surgen otras células troncales más comprometidas con determinados tejidos, que propiciarán células de tejidos específicos,⁶⁴ entre ellas se encuentran las células precursoras neurales, células capaces de diferenciar hacia los tipos celulares principales del sistema nervioso central: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.²⁰

Diversos grupos de investigación han cultivado células que *in vitro* se comportan como células troncales neurales; no obstante, su potencial real de diferenciación ha sido difícil de establecer, pues aún se desconocen las moléculas que promueven la diferenciación específica.^{65,66}

En algunos casos se ha hallado que los patrones de identidad celular no corresponden a los del tejido de origen.⁶⁷ Para valorar el potencial de células troncales, y en particular de los precursores neurales en mamíferos, se diseñó un sistema de implantación de células *in vitro* que permite la valoración del potencial de diferenciación de células troncales neurales, sin conocimiento de las moléculas específicas involucradas del entorno.^{67,68}

Con este sistema se muestra que las neuroesferas, una de las formas más frecuentes para crecer células troncales neurales, tienen en su mayoría células que

phorylation of proteins, an order to activate and deactivate gene groups is originated and there is where the cell can control or change its expression pattern.³

Chromosomal factors

The capacity of progenitor cells to transcribe telomerase protein, that is a ribonucleoprotein whose function is to add telomeric repetitions to the extremities of chromosomes, is correlated with the life span of cellular lineages.⁶⁹ The length of the telomeres of cromatides are related with the specialization degree of the cell, for this reason the more specialized cells posses shorter telomeres.⁷⁰

It has been observed that stem cells posses long telomeres and permanent constitutive telomerase activity;⁶⁹ nevertheless, one particularity of human diploid cells is that they do not express telomerase enzyme in their phenotype, for this reason its expectations as a molecular indicator is not very relevant, in contrast with other species where they are directly related with activity of the cellular cycle and age.⁷⁰

Regulation of the differentiation of ES cells and MAPC

A primary control mechanism to guarantee that genetically damaged cells do not divide and do not transmit genetic alterations, is the redundant recognition and verification during cellular proliferation given by protein P53, that is also used to keep genetic stability in embryonic cells.⁵⁸

The P53 is activated by DNA damage, and in embryonic cells directly suppresses the nanog gene expression, which is essential for regeneration of those cells. Suppression of nanog promotes the differentiation of stem cells in different types. P53 also contributes to the eventual damage elimination in the DNA of cells.³⁸

Molecular markers

The specific identification of embryonic progenitor or stem cells through molecular markers allows frequency and distribution recognition; how they proliferate in colonies, most of the experiments with stem cells will not start with individual cells but with large numbers of cells where several lineages can be present, each one with a unique potential; therefore, the importance of molecular markers to characterize the population composition.¹³

The surface markers are membrane surface protein that are expressed on cell type specific manner. In progenitor cells at membrane level,⁵⁸ although the references of findings of new markers is broad (cells CD34+, CD34-, as well as CD133+ CD38- have been

no originan neuronas en ambientes naturales de diferenciación.²⁰ Sin embargo, células troncoembrionarias y troncales derivadas del adulto pueden generar neuronas en este ambiente de diferenciación.^{66,67}

Activación, regulación e identificación de las CTE y de las MAPC

Cada célula eucariota expresa y utiliza la información correspondiente a su función, pero tiene igualmente almacenados los datos sobre cómo son y cómo deben funcionar las otras células del organismo al que pertenecen,^{3,7} porque al derivar de una célula inicial, el embrión unicelular o cigoto se divide sucesivamente, propiciando más células, haciendo en cada división copias idénticas de su ADN, con información de cómo es todo el individuo; activando y desactivando temporal y espacialmente los mecanismos de regulación y control que atañen a cada linaje celular.^{7,14}

Mecanismos internos de control

Mediante mecanismos internos, las células determinan las veces que deben dividirse antes de diferenciarse totalmente; mediante un complejo grupo de señales de corto y largo alcance entre células madre, sus hijas y las células vecinas pluripotentes realizan el control, activación y regulación³⁰ necesarios para los cambios de estadio de mórula a blástula, a gástrula y los sucesivos, coadyuvadas por citoquinas, proteínas que dirigen la maduración celular;³ proteínas promotoras e inhibidoras del ciclo celular, factor promotor de la mitosis, conformado por ciclinas y cinasas dependiente de ciclina CDK2; interacciones de las células con la matriz extracelular mediante receptores de membrana como las integrinas³ y por factores genéticos. Al ocurrir la primera diferenciación celular que genera la blástula, interviene el gen nanog, que sólo se activa en las CTE; se ha demostrado que su anulación lleva a la inespecificidad de las células pluripotenciales del blastocisto.³⁸

Mecanismos externos de control

Cuando las señales externas que llegan al receptor de membrana se reemiten dentro de la célula mediante una serie de reacciones bioquímicas de fosforilaciones y desfosforilaciones de proteínas, se origina un orden para activar o desactivar grupos de genes y es ahí donde la célula puede controlar o cambiar su patrón de expresión.³

Factores cromosomales

La capacidad de las células progenitoras para trans-

found) and it is considered immunophenotype characteristic of immature stage CD133+; nevertheless, in Table 2, only information on the most utilized for identifying progenitor cells is presented.^{12,38}

Promiscuity of progenitor and embryonic stem cells

The new era of biology and biotechnology has prompted to the knowledge of cellular characteristics that were thought restricted to few animal species; for instance, epigenetic nuclear reprogram in stem cells, transdifferentiation (change of cellular destiny, that gives place to other reminiscent tissues) and transdetermination (similar process to cellular cloning, in which the nucleus of a stem cell is subjected to genetic reprogram) in virtue of cellular fusion, they are attributed to the flexibility of adult cells.⁷¹

Likewise, the development of new ways of therapy has been possible because despite cellular determination, such as the stromal cells, has been identified, adding the intrinsic and extrinsic mechanisms of asymmetric division proper to embryogenesis, the cascade signalization and the cellular microenvironment accept the fusion.^{7,14}

Bioartificial tissues and cellular therapy

Recently, if it is needed to do *in vitro* a replica of a modified organism (for example, bacteria), only to resort to any of its cells and obtain that its information expresses and multiplies, entire colonies may be generated, using the appropriate technology; in the same way it happens with eukaryotic cells, because the protocols to make cells live and grow out of the organism are available, by means of advanced techniques of molecular biology, cellular culture and embryonic management.¹¹

Thus, to restore a specific functional deficit in a tissue implies to maintain in culture, cell lines that proliferate indefinitely such as ESC or pluripotent, and obtain isolated cells from adult tissues that can be reprogramed by proliferation and proper differentiation factors, into desired cellular phenotypes by cellular fusion; this technology is called cellular therapy or cellulomic.⁴¹

Thus, the same intra and intercellular principles that the organism uses in natural way for its self-repair,¹⁷ and the subcellular elements of tissue engineering, could be used for protocols searching for gradual change from sick to healthy cells, this is applicable, until now, only to certain body areas.^{7,11}

In 2001, Orlic *et al.*¹⁹ managed to repair the coronary damage experimentally provoked in female mice

cribir la proteína telomerasa, que es una ribonucleoproteína cuya función es adicionar repeticiones teloméricas a los extremos de los cromosomas, se correlaciona con las expectativas de vida de los linajes celulares;⁶⁹ según lo anterior, la longitud de los telómeros de las cromátides se relaciona con el grado de especialidad de la célula, por ello las células más especializadas poseen telómeros más cortos.⁷⁰

Se ha observado que las células madre poseen telómeros largos y actividad telomerasa constitutiva permanente;⁶⁹ sin embargo, una particularidad de las células diploides humanas es que no expresan la enzima telomerasa en su fenotipo, por ello sus expectativas como indicador molecular no es muy relevante, a diferencia de otras especies donde se relaciona directamente con la actividad del ciclo celular y con la edad.⁷⁰

Regulación de la diferenciación de las CTE y de las MAPC

Un mecanismo primario de control para garantizar que las células dañadas genéticamente no se dividan y no transmitan alteraciones, es el reconocimiento y verificación redundante durante la proliferación celular dada por la proteína P53, que también se utiliza para mantener la estabilidad genética en las células embrionarias.⁵⁸

La P53 activada por el daño en el ADN de las células embrionarias suprime directamente la expresión del gen nanog, que es imprescindible para la regeneración de esas células. La supresión del nanog promueve la diferenciación de las células madre embrionarias en diversos tipos. La P53 también contribuye a la eliminación eventual del daño en el ADN en las células.³⁸

Marcadores moleculares

La identificación concreta de las células progenitoras embrionarias o somáticas mediante marcadores moleculares permite reconocer su distribución y frecuencia; como proliferan en colonias, la mayoría de los experimentos con células madre inicia con una población no con células individuales; esto posibilita que estén presentes varios linajes, cada uno con un potencial único, de ahí la importancia de los marcadores para definir la composición de la población.¹³

Los marcadores de superficie son un tipo de proteína que se expresa en las células progenitoras a nivel de membrana,⁵⁸ aunque las referencias de hallazgos de nuevos marcadores es amplia (se han encontrado células CD34+, CD34-, así como CD38+ CD38-) y se considera inmunofenotipo característico de estadio inmaduro CD133+; sin embargo, en el Cuadro 2 sólo

Cuadro 2

MARCADORES MOLECULARES PARA CÉLULAS PROGENITORAS
Y TRONCOEMBRIONARIAS DE RATÓN^{11, 12}

MOLECULAR MARKERS FOR PROGENITOR AND EMBRYONIC STEM CELLS OF MOUSE^{11, 12}

Marker	Activity	In vitro function
Oct4	Transcription factor	Coadyuvates in cell renewal
STAT3	Transcription factor	Present in LIF activation
Nanog	Transcription factor	Maintains pluripotent stage
CD34+	Surface protein	Present in ES cells
SSEA1	Embryonic antigen	Specific stage of pluripotency
Alkaline phosphatase	Enzymatic protein	Phosphate hydrolysis

by cardiac infarction; these sick animals were injected near the zone damaged by the infarct with radioactively marked stem cells derived from bone marrow of adult mice; one week later it was proved that a proliferation of the inoculated cells along with a transformation of these into cardiac muscle cells and blood vessels forming cells was produced. In this study it was observed that newly differentiated cells were beginning to move towards the dead zone;^{19,72} other studies have notified chimerism of stem cells with cardiac cells.^{73,74}

In lymphoid organs like the thymus, that during infancy suffers a regression process until converted in islets⁴⁹ and which function is to intervene in T lymphocyte production,^{1,40} the sites that control the capacity for these to detect foreign invasions and the mechanisms which detain them in order not to attack tissues of the proper organism were studied; during the research it was found that stem cells were part of the immune system and thus propagated, in mice, the cells that give origin to thymus epithelium, generating a bioartificial tissue.²⁶

In other study, it was proposed to produce pluripotent stem cells that contribute to the modified nuclear genome and induce its differentiation into cells that replace sick cells: myocardiocytes that substitute myocardium after a stroke; or beta cells producers of insulin in the case of diabetic patients.⁷⁵

Another tendency is the obtainment of patient's own cells, donor of a cell type (that is programed) and a cellular receptor in another body area that it is affected and needed of therapy; the analogous transplant alternative presents some advantages for the complete immunotolerance in the same individual receptor-donor complex.¹⁸

se presenta la información de los más utilizados para identificar células progenitoras.^{12,38}

Promiscuidad de las células progenitoras y de las células troncoembrionarias

La nueva era de la biología y la biotecnología ha permitido conocer cualidades celulares que se creían restringidas a pocas especies animales; así, la reprogramación nuclear epigenética en células somáticas, la transdiferenciación (cambio de destino celular, que da lugar a otros tejidos reminiscentes) y la transdeterminación (proceso similar a la clonación celular, en el que el núcleo de una célula somática se somete a reprogramación genética) en virtud de la fusión celular, se atribuyen a la flexibilidad de las células adultas.⁷¹

Asimismo, el desarrollo de nuevas formas de terapia ha sido posible porque se ha identificado el comportamiento de determinación de células como las estromales, que sumando los mecanismos intrínseco y extrínseco de división asimétrica propios de la embriogénesis, las vías de señalización en cascada y la influencia del microambiente celular aceptan el proceso de fusión.^{7,14}

Tejidos bioartificiales y terapia celular

Actualmente, si se necesita hacer *in vitro* una réplica de un organismo modificado (bacterias, por ejemplo), sólo con recurrir a cualquiera de sus células y conseguir que su información se exprese y se multiplique, se pueden generar colonias enteras, usando la tecnología apropiada; de manera análoga ocurre con las células eucarióticas, porque se dispone de los protocolos para conseguir que las células vivan y crez-

Progenitor cells and cloning

Cloning concept and its application possibilities has had an enormous change since Briggs and King,⁷⁶ in a today's classic experiment, they performed the first cloning of animal from the skin cell of a frog—that is specialized adult type cell—, where all cells have DNA in their nucleus.

While perforating the cellular membrane with a micropipette, its nucleus (donor nucleus) was extracted by suction and, parallelly, the nucleus was removed from a fecundated oocyte of the same species; with this, the future receptor cell was deprived of the genetic information that, in natural conditions, contains the message that conduces to the development of a normal individual, and the donor nucleus was introduced in the enucleated receptor oocyte.

After incubation, that hybrid ovocyte developed into a tadpole and after the metamorphosis process an adult frog emerged; that is, the production of a copy almost identical of an individual.

From this moment on, similar experiments were done, but only later, with the cloning of Dolly⁷⁷ the sheep, did those types of works had any relevance.

Now the combination of tools of molecular and cellular bioengineering are a promising alternative in the diagnosis, with techniques of polymerase chain reaction (PCR) in real time and autologous cloning therapeutic, the critical problem of immunological incompatibility can be eliminated, opening the door to a new challenge: organ and tissue engineering.⁷¹

For reprogramming that occurs during cloning of an adult stem cell nucleus, that contains the precise information of its species, how it is and how it is structured, it is necessary to recreate the reminiscent microenvironment which allows to carry out the process.^{7,14,71}

Nevertheless, there is absence of cloning experiments that prove that it is a unique cell and not an heterogenous population the cause of differential potential; therefore, it is a proof that experiments are still missing to ratify or discard this isolation.⁵⁰

Discussion

As highlighted in the text, the enormous potential that represents the use of adult and embryonic progenitor cells, as well as its differential function is clear to see, for which it is recommended to continue its study.

Likewise, it is observed that, according to the preliminary results of researches, it is viable the use of embryonic stem cells for experimental models, and for multipotent adult progenitor cells for therapy in transplanted tissues, reprogramming and cloning.^{11,71}

Researches from the last two decades⁴⁴ show the importance of these cells in human health for treat-

can fuera del organismo, mediante técnicas avanzadas de biología molecular, cultivo celular y manejo de embriones.¹¹

Así, restaurar un déficit funcional específico en un tejido implica mantener en cultivo por periodos prolongados, líneas celulares que proliferen indefinidamente como CTE o pluripotentes, y obtener células aisladas de tejidos adultos que puedan ser reprogramadas mediante factores de crecimiento y de diferenciación apropiados, hacia fenotipos celulares deseados por fusión celular; esta tecnología se denomina terapia celular o celulómica.⁴¹

Así, se aprovechan los mismos principios intra e intercelulares que el organismo usa de manera natural para su autorreparación,¹⁷ y los elementos subcelulares de la ingeniería de tejidos, empleando protocolos idóneos para el cambio paulatino de células enfermas por células sanas, esto es aplicable, hasta ahora, sólo a determinadas áreas corporales.^{7,11}

Orlic *et al.*, en 2001,¹⁹ lograron reparar el daño coronario provocado experimentalmente en ratonas por un infarto cardiaco; estos animales enfermos fueron inyectados en una región cercana a la zona lesionada por el infarto con células madre marcadas radiactivamente y procedentes de la médula ósea de ratones adultos; una semana después se comprobó que se producía una proliferación de las células inoculadas junto con una transformación de ellas hacia células musculares cardiacas y células formadoras de vasos sanguíneos. En este trabajo se observó que estas nuevas células miocárdicas y vasculares comenzaban a desplazarse hacia la zona muerta;^{19,72} otros trabajos han notificado quimerismo de las células madre con las células cardiacas.^{73,74}

En órganos linfoides como el timo, que durante la infancia sufre un proceso de regresión hasta quedar convertido en islotes⁴⁹ y cuya función es intervenir en la producción de los linfocitos T,^{1,40} se estudiaron los sitios que controlan la capacidad de éstos para detectar invasores foráneos y el mecanismo que los detiene para que no ataquen a los tejidos del propio organismo; durante la investigación se encontró que las células madre formaban parte del sistema inmunitario y así propagaron en ratones las células que dan origen al epitelio del timo, generando un tejido bioartificial.²⁶

En otro estudio²⁴ se propuso producir células troncales pluripotentes que aporten el genoma nuclear modificado e inducir su diferenciación a células que reemplacen a otras enfermas: miocardiocitos que sustituyan tejido del miocardio lesionado tras un infarto; o bien a células beta productoras de insulina en el caso de pacientes diabéticos.⁷⁵

Otra tendencia es la obtención de células del propio paciente, donante de un tipo celular (que se

ment and prevention of diseases, and in animal production, as in bioreactors for recombinant protein production, that generate animals of high aggregated value;^{24,45,46} in this context, it is observed that the potentiality of these cellular populations, their ability to derived into different cellular lines and their *in vitro* survival, are useful advantages.^{41,44,71}

Nevertheless, the generated research is not enough because each study opens new doors to the unknown, so the use of stem cells' technology is still limited because the answers depend on not yet ponderable variables;^{6,15,18} therefore, the knowledge of the mechanisms through which these cells achieve to maintain their characteristics, will contribute to make appropriate use of them.⁷¹ In regard to, recent studies indicate that biochemical environment of cellular surrounding is important in the behavior of these cells,^{2,14,17} because *in vivo* cellular nidus' surrounding and the signalization routes orient the biodistribution and changes in these cells.^{12,14}

Likewise, it is important to highlight that, since now, it has been possible to isolate human and mice embryonic stem cell lines, with the advantage of being pluripotent, but with the characteristic limitations of the species;¹⁶ in the case of multipotent adult progenitor cells, studies are still insipid, because these cells are difficult to find in tissues and culture is complex; nevertheless, they adhere very well to tissues and *in vivo* rapidly migrate.^{17,30}

More recent researches on obtainment and maintenance of progenitor cells are directed to improve complete protocols and to develop better culture media that will allow to obtain consistent results on derivation.¹⁵

The future of the method's development for manipulation of pluripotent embryonic stem cells and multipotent adult progenitor cells, will depend on the obtainment of more basic information about action mechanisms and precise biochemical changes, of markers and the ligand-receptor complexes that induce to differentiation, dedifferentiation, transdifferentiation and non differentiation.^{43,71}

This cellular and molecular technology, in medical field, represents an alternative for treatment of diseases of difficult prognosis and management diseases, while in farm animals it is another alternative of production.^{45,46}

The value of progenitor cells lies in its versatility as intermediates in diagnosis and therapy, as well as in the recombinant production of high value protein.⁴⁴

Implications

The embryonic progenitor cells and multipotent adult progenitor cells, for their properties and characteris-

reprograma) y un receptor celular en otra área de su cuerpo que esté afectada y necesite terapia; la alternativa del trasplante autólogo presenta algunas ventajas por la completa inmunotolerancia dentro del complejo receptor-donador en un mismo individuo.¹⁸

Células progenitoras y clonación

El concepto de clonación y sus posibles aplicaciones ha tenido un enorme cambio desde que Briggs y King,⁷⁶ en un experimento que hoy es clásico, realizaron la primera clonación de un animal de la célula cutánea de una rana —que es un tipo celular adulto especializado—, donde todas las células tienen ADN en sus núcleos.

Al perforar la membrana celular con una micropipeta, se extrajo por succión su núcleo (núcleo donante) y paralelamente se removió el núcleo de un oocito fecundado de la misma especie, con ello se privó a la futura célula receptora de la información genética que, en condiciones naturales, contiene el mensaje que conduce al desarrollo de un individuo normal, y se introdujo el núcleo donante en el oocito receptor enucleado.

Luego de incubado, ese ovocito híbrido se desarrolló en un renacuajo y tras el proceso de metamorfosis surgió una rana adulta normal; es decir, la producción de una copia casi idéntica de un individuo.

A partir de entonces se realizaron experimentos similares, pero sólo después, con la clonación de la oveja Dolly,⁷⁷ ese tipo de trabajos tuvieron trascendencia.

Ahora la combinación de herramientas de bioingeniería molecular y celular son una promisoría alternativa en el diagnóstico, con las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real y la terapéutica del clonaje autólogo, se puede eliminar el problema crítico de la incompatibilidad inmunológica, abriendo la puerta a un nuevo reto: la ingeniería de órganos y de tejidos.⁷¹

Para la reprogramación que ocurre en la clonación de un núcleo somático adulto, que contiene la información precisa de su especie, cómo es y cómo se estructura, es necesario recrear el microambiente resminiscente que permita llevar a término el proceso.^{7,14,71}

Sin embargo, hay ausencia de experimentos clonales que prueben que es una única célula y no una población heterogénea la causante del potencial diferenciador; por lo tanto, es una prueba de que aún faltan experimentos para ratificar o descartar este aislamiento.⁵⁰

tics, facilitate their use in a wide range of applications, whose implications would be: a) greater availability of therapeutic resources; b) technology usefulness and of the natural mechanisms of cellular functioning, for artificial reprogramming; c) treatment possibility for a greater number of patients with difficult management diseases; d) implicitly generates greater dependence of high technology.

It can not be left out mentioning the teratogenic potentiality of these processes, because conditions needed for specific cellular differentiation have not been established with clarity.^{11,71}

Besides, high cost of investments in time, money and human capital implicate limitations in this area of knowledge.

Notwithstanding the vertiginous development in this research field and the great number of studies that have been done, technology validity associated with progenitor cells in many incidence areas is still missing, but it is worth the effort, possible benefits are not in the medical area, but in animal production.

Acknowledgements

Special thanks for the invaluable and generous support from the Library of the Biotechnology Institute from the National Autonomous University of Mexico, in Cuernavaca, Morelos, Mexico; especially to bibliotecnologist Zaida Penton, for her help in the localization and acquisition of great part of the hemerographic material in this study.

Referencias

1. Gilbert S F. Developmental Biology, 6th ed. Sunderland (MA): Sinauer As Inc, 2000.
2. Markert CL, Ursprung H. Developmental Genetics. New Jersey EUA:Prentice-Hall, Inc, 1971.
3. Robertis DPE, Ponzio HIB. Biología Celular y Molecular. Buenos Aires: El Ateneo, 1998.
4. Gardner RL, Papaioannou VE. Origin and differentiation of embryonic tissues. In: Balls M, Wild A, editors. The early development of mammals. Cambridge, England: Cambridge Univ Press. 1975.
5. Ursprung H, Smith KD, Sofer WH, Sullivan DT. Assay Systems for the Study of Gene Function: Two assay systems, the syntheses of protein. Science 1968; 160: 1075-1081.
6. Weise C, Kania G, Rolletschek A, Blyszczuk P, Wobus AM. Pluripotency capacity for *in vitro* differentiation of undifferentiated embryonic stem cells. Methods Mol Biol 2006;325:181-205.
7. Kiger AA, White-Cooper H, Fuller MT. Somatic support cells restrict germline stem cell self-renewal and promote differentiation. Nature 2000; 407:750-754.
8. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned

Discusión

Según los aspectos tratados en el texto, es claro el enorme potencial que representa el uso de las células progenitoras adultas y embrionarias, así como su función diferencial, por lo que es recomendable se continúe estudiando.

De igual manera, se observa que, de acuerdo con los resultados preliminares de las investigaciones, es viable el uso de células troncoembrionarias para modelos experimentales, y de las células multipotentes somáticas para terapéutica en el trasplante de tejidos, reprogramación y clonación de células somáticas.^{11,71}

Las investigaciones de las dos últimas décadas⁴⁴ muestran la importancia de estas células en la salud humana para el tratamiento y prevención de enfermedades, y en la producción animal, como biorreactores para la producción de proteína recombinante, que genera animales de alto valor agregado;^{24,45,46} en este contexto, se observa que la potencialidad de estas poblaciones celulares, su habilidad para derivar en diferentes líneas celulares y su supervivencia *in vitro*, son ventajas aprovechables.^{41,44,71}

No obstante, la investigación que se genera no es suficiente porque cada estudio abre nuevas incógnitas, de manera que el uso de la tecnología de las células madre aún es limitado porque las respuestas dependen de variables aún no ponderadas;^{6,15,18} por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos a través de los cuales estas células logran mantener sus características, contribuirá a hacer un uso apropiado de ellas.⁷¹ Al respecto, estudios recientes indican que el ambiente bioquímico del entorno celular es importante en el comportamiento de estas células,^{2,14,17} porque *in vivo* el entorno del nicho celular y las vías de señalización orientan la biodistribución y los cambios en estas células.^{12,14}

Asimismo, es importante notar que hasta ahora sólo se ha logrado aislar líneas celulares troncoembrionarias humanas y de ratón, con la ventaja de ser pluripotentes, pero con las consecuentes limitaciones de especie;¹⁶ en el caso de las células somáticas multipotentes, los estudios son aún más incipientes, porque estas células son difíciles de encontrar en los tejidos y el cultivo es complejo; sin embargo, se adhieren muy bien a los tejidos y migran rápidamente *in vivo*.^{17,30}

Las investigaciones más recientes sobre la obtención y mantenimiento de las células progenitoras se encaminan al mejoramiento en los protocolos completos y en los medios de cultivo que permitirán tener resultados consistentes en derivación.¹⁵

El futuro en el desarrollo de métodos para la manipulación de las células troncoembrionarias pluripotentes y de las células somáticas multipotentes,

- by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:7634-7638.
9. Robertson EJ. Teratocarcinomas and embryonic stem cells: A practical Approach. Oxford, England: IRL Press, 1987.
 10. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981;292:154-156.
 11. Thomson AJ, McWhir J. Gene Targeting and Embryonic Stem Cells. London and New York: Bios Scientific Pub. 2004.
 12. Lakshminpathy U, Pelacho B, Sudo K, Linehan JL, Coucouvanis E, Verfaillie CM *et al.* Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells* 2004;22:531-543.
 13. Abbondanzo SJ, Gadi I, Stewart. Derivation of embryonic stem cells lines. *Methods Emzymol* 1993;225:803-855.
 14. Tolar J, O'Shaughnessy MJ, Panoskaltsis-Mortari A, McElmurry RT, Bell S, Blazar BR *et al.* Host factors that impact the biodistribution and persistence of multipotent adult progenitor cells. *J Blood* 2006;107:82-88.
 15. Tran J, Brenner TJ, Dinardo S. Somatic control over the germline stem cell lineage during *Drosophila spermatogenesis*. *Nature* 2000;407:754-757.
 16. Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M, Verfaillie CM. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain. *Exp Hematol* 2002;30:896-904.
 17. Conti L, Pollar SM, Gorba T, Reitano E, Smith A. Niche-independent symmetrical self-renewal of a mammalian tissue stem cell. *PLoS Biol* 2005;3(9):283.
 18. Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002; 416:545-548.
 19. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson S.M, Li B. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410:701-705.
 20. Jiang Y, Henderson D, Blackstad M, Chen A, Miller RF, Verfaillie CM. Neuroectodermal differentiation from mouse multipotent adult progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100 Suppl 1:11854-11856.
 21. Passegue E, Wagers AJ. Regulating quiescence: New insights into hematopoietic stem cell biology. *Dev Cell* 2006;10:415-417.
 22. Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Jiang Y, Largaespada DA, Verfaillie CM, Low WC. Neural differentiation and incorporation of bone marrow-derived multipotent adult progenitor cells after single cell transplantation into blastocyst stage mouse embryos. *Cell transplant* 2003;12:201-213.
 23. Korbiling M, Katz RL, Khanna A, Ruifrok AC, Rondon G, Estrov Z *et al.* Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral-blood stem cells. *N Engl J Med* 2002;346:738-746.
 24. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Goodell MA *et al.* Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 2001;107:1395-1402.
 25. Kramer J, Hegert C, Guan K, Wobus AM, Muller PK,

dependerá de la obtención de más información básica acerca de los mecanismos de acción y cambios bioquímicos precisos, de los marcadores y de los complejos ligando-receptor que inducen a la diferenciación, desdiferenciación, transdiferenciación y no diferenciación.^{43,71}

Esta tecnología celular y molecular en el ámbito médico representa una alternativa para el tratamiento de enfermedades de difícil pronóstico y manejo, mientras que para los animales de granja es otra alternativa de producción.^{45,46}

El valor de las células progenitoras radica en su versatilidad como intermediarias en diagnóstico y terapia, así como en la producción de recombinantes de alto valor proteínico.⁴⁴

Implicaciones

Las células progenitoras embrionarias y somáticas, por sus características y propiedades, posibilitan su uso en un amplio rango de aplicaciones, cuyas implicaciones serían: a) mayor disponibilidad de recursos terapéuticos; b) aprovechamiento de la tecnología y de los mecanismos naturales del funcionamiento celular, para hacer reprogramación artificial; c) posibilidad de tratamiento para un mayor número de enfermos con padecimientos difíciles de manejar; d) implícitamente se genera mayor dependencia de la alta tecnología.

No se puede dejar de mencionar la potencialidad teratogénica de estos procesos, porque aún no se han establecido con claridad las condiciones necesarias para la diferenciación celular específica.^{11,71}

Además, el alto costo de las inversiones en tiempo, dinero y capital humano implican una limitante para el avance en esta área del conocimiento.

No obstante el vertiginoso desarrollo en este campo de investigación y el gran número de estudios que se realizan, aún falta la validación de la tecnología que se asocia con las células progenitoras en muchas áreas de incidencia, pero amerita el esfuerzo, los posibles beneficios no sólo en el área médica, sino en el área de producción animal.

Agradecimientos

Se agradece el invaluable y generoso apoyo de la Biblioteca del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Cuernavaca, Morelos, México; en especial a la bibliotecóloga Zaida Penton, por su ayuda en la localización y adquisición de gran parte del material hemerográfico de este trabajo.

- Rohwedel J. Embryonic stem cell-derived chondrogenic differentiation *in vitro*: activation by BMP-2 and BMP-4. *Mech Dev* 2000;92:193-205.
26. Gill J, Malin M, Hollander GA, Boyd R. Generation of a complete thymic microenvironment by MTS24(+) thymic epithelial cells. *Nat Immunol* 2002;3:635-642.
 27. Koc ON, Peters C, Aubourg P, Raghavan S, Dyhouse S, Krivit W *et al*. Bone marrow derived mesenchymal stem cells remain host-derived despite successful hematopoietic engraftment after allogeneic transplantation in patients with lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Exp Hematol* 1999;27:1675-1681.
 28. Choi Y, Ta M, Atouf F, Lumelsky N. Adult pancreas generates multipotent stem cells and pancreatic and nonpancreatic progeny. *Stem cells* 2004;22:1070-1084.
 29. Hogan BL, Beddington R, Costantini F, Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*. 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.
 30. Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:5709-5712.
 31. Anwar M, Ullah N. Early development and location of embryos in the reproductive tract of Nili Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*): a retrospective analysis. *Theriogenology* 1998;49:1187-1193.
 32. Sadler TW. *Langman's Medical Embryology*. Baltimore and Philadelphia: Ed. William & William Inc, 2004.
 33. Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotent embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 1992;70:841-847.
 34. Gallagher EJ, Lodge P, Ansel R, McWhit J. Isolation of murine embryonic stem and embryonic germ cells by selective ablation. *Trans Res* 2003;12:451-460.
 35. Damjanov I, Solter D. Animal Model of human disease: teratoma and teratocarcinoma. *Am J Pathol* 1976;83:241-244.
 36. Moore K, Persaud TVN. *Embriología clínica*. 7^a ed. Madrid: Ediciones Harcourt, 2006.
 37. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Gearing DP, Gough NM *et al*. Myeloid Leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential Of embryonic stem cells. *Nature* 1988;336:684-687.
 38. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Yamanaka S *et al*. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 2003;113:631-642.
 39. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel J, Marshall VS *et al*. Embryonic stem cells lines derived from Human blastocyst. *Science* 1998;282:1145-1147.
 40. Gartner LP, Hiatt JL. *Atlas de Histología*, 2^a ed. Philadelphia, Pennsylvania: McGraw-Hill, 2002.
 41. Rolletschek A, Blyszczuk P, Wobus AM. Embryonic stem cell-derived cardiac, neuronal and pancreatic cells as model systems to study toxicological effects. *Elsevier Toxicol Lett* 2004;149:361-369.
 42. Kirk R, Capecchi RM. Site-Directed Mutagenesis by gene targeting in mouse Embryo-Derived Stem Cells. *Cell* 1987;51:503-512.
 43. Ramirez SR, Davies A, Bradley A. Gene targeting in embryonic stem Cells. *Methods Enzymol* 1992; 225:855-878.
 44. Houdebine LM. The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. *J Biotechnol* 2002;98:145-160.
 45. McCreath KJ, Howcroft J, Campbell KHS, Coleman A, Schnieke AE, Kind AJ. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from culture somatic cell. *Nature* 2000;405:1066-1069.
 46. Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, Wilmut I, Campbell KHS. Human Factor IX Transgenic of Nuclei from Transfected Fetal Fibroblasts. *Science* 1997; 78:2130-2133.
 47. Chiquoine AD. The identification, origin and migration of the primordial germ cells of the mouse embryo. *Anat Rec* 1954;118:135-146.
 48. Donovan P, Stott D, Carns LA, Heasman J, Wylie CC. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 1986; 44:831-838.
 49. Covarrubias L. La plasticidad genómica durante la diferenciación celular: Perspectivas desde las células troncales y la clonación nuclear. En: Adolfo Martínez Palomo, editor. *Fronteras de la biología en los inicios del siglo XXI*. México DF:El Colegio Nacional, 2002.
 50. Rothenburger M, Volker W, Vischer JP, Berendes E, Glasmacher B, Scheld HH *et al*. Tissue engineering of heart valves: formation of a three- dimensional tissue using porcine heart valve cells. *ASAIO J* 2002;48:586-591.
 51. Hakkinen L, Koivisto L, Larjava H. An improved method for culture of epidermal keratinocytes from newborn mouse skin. *Methods Cell Sci* 2001;23:189-196.
 52. Blindt R, Vogt F, Astafieva I, Fach C, Hoffmann R, Weber C *et al*. A novel drug-eluting stent coated with an integrin-binding cyclic Arg-Gly-Asp peptide inhibits neointimal hyperplasia by recruiting endothelial progenitor cells. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:1786-1795.
 53. Samadikuchaksaraei IK, Rippon HJ, Polak JM, Bielby RC, Cohen S, Bishop AE. Derivation of distal airway epithelium from human embryonic stem cells. *Tissue Eng* 2006;12:867-875.
 54. Kawano S, Morotomi T, Toyono T, Nakamura Harada H, Uchida T. Establishment of dental epithelial cell line (HAT-7) and the cell differentiation dependent on Notch signaling pathway. *Connect Tissue Res* 2002;43:409-412.
 55. Domínguez HVU, Rojas DS. Alternativas para la obtención de injertos óseos. *Acta Ortop México* 2002;16:225-230.
 56. Seeberger KL, Dufour JM, Shapiro AM, Lakey JR, Rajotte RV, Korbitt GS. Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. *Lab Invest* 2006;86:141-153.
 57. Nishimura K, Solchaga LA, Caplan AI, Yoo JU, Goldberg VM, Johnstone B. Chondroprogenitor cells of synovial tissue. *Arthritis Rheum* 1999;42(12):263-267.
 58. Drucker CR. *Fisiología Médica*. México, DF: Ed. El Manual Moderno, 2005.

59. Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Grompe M *et al.* Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 2000;6:1229-1234.
60. Wulf GG, Luo KL, Jackson KA, Bremer MK, Goodell MA. Cells of the hepatic side population contribute to liver regeneration and can be replenished with bone marrow stem cells. *Haematologica* 2003;88:368-378.
61. Nayernia K, Nolte J, Lee JH, Drusenheimer N, Wulf G, Engel W *et al.* Derivation of male germ cells from bone marrow stem cells. *Lab Invest* 2006;86:654-663.
62. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz D M, Nakano Y *et al.* Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416:542-545.
63. Ivanovic Z, Hermitte F, de la Grange PB, Vezon G, Praloran V, Uchida T *et al.* Simultaneous maintenance of human cord blood SCID-repopulating cells and expansion of committed progenitors at low O₂ concentration (3%). *Stem Cells* 2004;22:716-724.
64. Lee WC, Zhong C, Quian S. Phenotype function and *in vivo* migrate survival of allogenic and dendritic cell progenitors genetically engineered to express TGF- β . *Transplantation* 1998;66:1810-1817.
65. Billon N, Jolicœur C, Ying QL, Smith A, Raff M. Normal timing of oligodendrocyte development from genetically engineered lineage-selectable mouse ES cells. *J Cell Sci* 2002;115(18):57-65.
66. Kim JH. Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease. *Nature* 2002; 41:850-856.
67. Safford KM, Hicok KC, Rice H, Safford SD, Gimble JM, Rice HE *et al.* Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Comm* 2002;294:371-379.
68. Santa-Olalla J, Baizabal JM, Fregoso M, del Carmen Cardenas M, Covarrubias L. The *in vivo* positional identity gene expression code is not preserved in neural stem cells grown in culture. *Eur J Neurosci* 2002;18:1073-1084.
69. Betts D H, King W A. Telomerase activity and telomere detection during early bovine development. *Dev Genet* 1999;25:397-403.
70. Allsopp RC, Cheshier S, Weissman IL. Telomere shortening accompanies increased cell cycle activity during serial transplantation of hematopoietic stem cells. *Exp Med* 2001;193:917-924.
71. Piedrahita JA, Mir B, Dindot S, Walker S. Somatic Cell Cloning: The Ultimate Form of Nuclear Reprogramming. *J Am Soc Nephrol* 2004;15:1140-1144.
72. Cao F, Lin S, Xie X, Ray P, Patel M, Wu JC *et al.* *In vivo* visualization of Embryonic stem cell survival, proliferation and migration after cardiac delivery. *Circ J* 2006;113:1005-1014.
73. Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal-Ginard B. Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med* 2002;346:5-15.
74. Rodriguez A, Duran A, Selloum M, Champy MF, Meco MT, Moscat J *et al.* Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signalling adapter p62. *Cell Metab* 2006;3:211-222.
75. Moncman CL, Rindt H, Robbins J, Winkelmann DA. Segregated assembly of muscle myosin expressed in nonmuscle cells. *Mol Biol Cell* 1993;4:1051-1067.
76. Briggs R, King TJ. Nuclear transplantation studies on the early gastrula (*Rana pipiens*) I. Nuclei of presumptive endoderm. *Dev Biol* 1960;2:252-270.
77. Wilmut I, Schnieke E, McWhir J, Kind J, Campbell K. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385:810-813.