

Biología de las Células Stem

Juan Carlos Munévar Niño¹, Andrea del Pilar Becerra Calixto², Angélica María Hernández Díaz¹

¹ Instituto Unidad de Investigación Básica Oral (U.I.B.O) Universidad El Bosque.

² Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

Correspondencia: munevarjuan@unbosque.edu.co.

Recibido: 21-04-2005 / Aceptado: 09-05-2005

Resumen

Durante siglos el hombre ha tratado de comprender la capacidad del cuerpo para reparar y reemplazar las células y tejidos del organismo. Después de años de trabajo dilucidando el cómo y el porqué de los mecanismos de reparación y regeneración tisular, los científicos se han enfocado en la investigación de las *células stem*. La identificación y aislamiento de éstas a partir de numerosos tejidos embrionarios y posnatales provee bases apropiadas para una variedad de prácticas biotecnológicas denominadas *medicina regenerativa* e *ingeniería tisular*. Desde el descubrimiento de la capacidad de las células stem adultas para formar diferentes tipos de tejidos *in vivo* e *in vitro*, como una fuente alternativa para las células stem embrionarias, se generó un amplio potencial terapéutico para los seres humanos.

En este marco, consideramos interesante describir la biología de las células stem, los parámetros básicos para su clasificación, las propiedades que permiten identificarlas y caracterizarlas *ex vivo* e *in situ*, así como los mecanismos moleculares y celulares involucrados en su auto renovación y diferenciación. Así mismo, analizamos la plasticidad de las células stem como su capacidad de diferenciación en células con un fenotipo de un tejido distinto al de su origen embriológico, específicamente en células hematopoyéticas y mesenquimatosas de la médula ósea. Por último, describimos algunos marcadores moleculares que permiten identificarlas en distintos tejidos posnatales. Este conocimiento es fundamental para continuar con el desarrollo de nuevos proyectos que permitan dar nuevas luces acerca de la biología de las células stem.

Palabras clave: células stem, medicina regenerativa, biología, plasticidad, fenotipo.

Abstract

Stem cells biology: For centuries, the man has been seeking to understand the body's ability to repair and replace the cells and tissues of the organism. After years of work pursuing the how and why of tissue repair and regeneration mechanisms, scientists have focused their attention on Stem cells. The identification and isolation of Stem cells from a number of embryonic and postnatal tissues provides appropriate targets for varied biotechnological practices referred to generally as Regenerative Medicine and Tissue Engineering. Since the discovery that adult stem cells have the potential to form many different tissue types *in vivo* and *in vitro* and can be an alternative source for embryo Stem cells offering wide therapeutic potentials for human beings. For these reasons we considered interesting to describe the stem cells biology, the basic parameters for its classification, the special properties are analyzed that allow to their identification and characterization *ex vivo* and *in situ*, the molecular and cellular mechanisms involved in self renewal and differentiation. The plasticity of the stem cells is analyzed like the property of differentiation in cells with a different phenotype

from the one its embryonic origin, specifically in hematopoietic stem cells and mesenchyme stem cells of bone marrow. Finally, some molecular markers are described that allow identifying the stem cells in different postnatal sources. It is important to continue with the studies and research with the purpose of increasing the knowledge body on Stem cells biology.

Key words: stem cells, regenerative medicine, biology, niches, plasticity, phenotype.

Introducción

Durante siglos el hombre ha tratado de comprender la capacidad del cuerpo para reparar o reemplazar las células y tejidos del organismo. Después de años de trabajo dilucidando el cómo y el porqué de los mecanismos de reparación y regeneración tisular, los científicos han enfocado su atención hacia la profundización en el conocimiento sobre células stem. En efecto, la biología de las células stem y su potencial uso en la medicina regenerativa e ingeniería de tejidos son objeto de intensa investigación en muchos laboratorios del mundo, gracias a la prometedora posibilidad de ser utilizadas como agentes terapéuticos en tejidos afectados por lesiones o entidades patológicas. En realidad, la regeneración de estructuras tisulares y de órganos lesionados en el cuerpo, cautivó la imaginación humana desde tiempos que remontan a la antigua Grecia.

El remoto origen de esta temprana fascinación se puede observar en la mitología griega. La hidra de múltiples cabezas casi derrota a Herácles pues le crecían dos nuevas cabezas por cada una que cortara el héroe y el hígado de Prometeo encadenado devorado por un águila hambrienta cada noche, se regeneraba a la mañana siguiente. Aristóteles (384 - 322 a.c.), observaba como se regeneraban las colas de lagartos y serpientes, así como los ojos de las golondrinas (1). En el siglo XVIII científicos como Abraham Trembley, Charles Bonnet, Peter Simon Pallas, y Lazzaro Spallanzani; descubrieron notables habilidades de regeneración en una variedad de organismos como las hidras, los gusanos de tierra, los caracoles, las ranas premetamórficas, lagartijas y salamandras.

En el año 1712 este concepto empezó a tomar bases científicas cuando el investigador francés René - Antoine Ferchault de Réaumur publicó su trabajo de regeneración de las extremidades y garras en el cangrejo, en donde se describieron una serie de descubrimientos que causaron un gran impacto en las ciencias biológicas y médicas. Por esas razones, en el transcurso del siglo XIX y parte del siglo XX la investigación en regeneración tisular se enfocó primordialmente en la fenomenología de la regeneración y sus fundamentos celulares (2).

Las observaciones de este período, permitieron llegar a la conclusión general de que las células progenitoras son requeridas para la mayoría de procesos regenerativos; sin embargo, los mecanismos de regeneración varían según el origen de esas células. Se observó que en algunos casos como en los de regeneración de la piel, sangre, músculo y hueso en los mamíferos, ó durante el reemplazo de tejidos perdidos en gusanos existen células de reserva denominadas *stem cells*, que solo necesitan ser activadas como respuesta a un daño o agresión tisular.

En otros casos, las células progenitoras pueden originarse *de novo* mediante un proceso en el cual las células totalmente diferenciadas invierten sus procesos de desarrollo normales para dar lugar a células progenitoras en proliferación. Este último proceso conocido como *desdiferenciación*, es evidente en vertebrados con capacidades excepcionales de regeneración, como las salamandras (3). El extraordinario grado de plasticidad celular permite distinguir a los vertebrados que pueden reemplazar estructuras

anatómicas completas, de vertebrados con capacidades de regeneración más limitadas.

Los científicos realizan un duro trabajo para entender los procesos involucrados en las vías de diferenciación y de desarrollo mediante las cuales las células stem pueden reparar los tejidos afectados reconstruyendo la estructura y función. Por lo tanto, se ha despertado un renovado interés en la regeneración de tejidos gracias a la investigación con células stem y a las grandes expectativas generadas en el campo de la ingeniería tisular y la medicina regenerativa Figura 1

La primera célula stem humana fue aislada a partir de un embrión en 1998 (4). Los estudios sobre la diferenciación y utilización terapéutica de las células madre o “*stem cells*” en seres humanos ha generado discusiones y una serie de debates éticos y políticos continuos. Desde el año 2001 se hicieron declaraciones conflictivas que crearon confusión en la población mundial en sobre las consideraciones éticas y la factibilidad de los tratamientos médicos con células stem (5).

Sin embargo hoy día, en el supuesto caso de levantar las restricciones legales y financieras, probablemente los médicos no podrán empezar a tratar sus pacientes con las células stem inmediatamente porque aún existen obstáculos técnicos por superar e interrogantes que resolver, antes de empezar a utilizarlas con fines terapéuticos de manera exitosa. Por ejemplo, las técnicas para manipular la diferenciación de las células stem hacia fenotipos celulares específicos están lejos de ser perfectas, ya que existe la posibilidad de que surjan resultados inesperados. Los aspectos éticos sobre el origen celular se encuentran estrechamente ligados con el potencial terapéutico.

Existen varias fuentes de células stem humanas: embriones humanos pre-implantados (4) Figura 2, tejido fetal humano (cordón umbilical) (7), células germinales tumorales humanas (6) y algunos tejidos adultos postnatales como: medula ósea, sangre periférica, cerebro, piel, pulpa dental, ligamento periodontal (9- 10, 13-15).

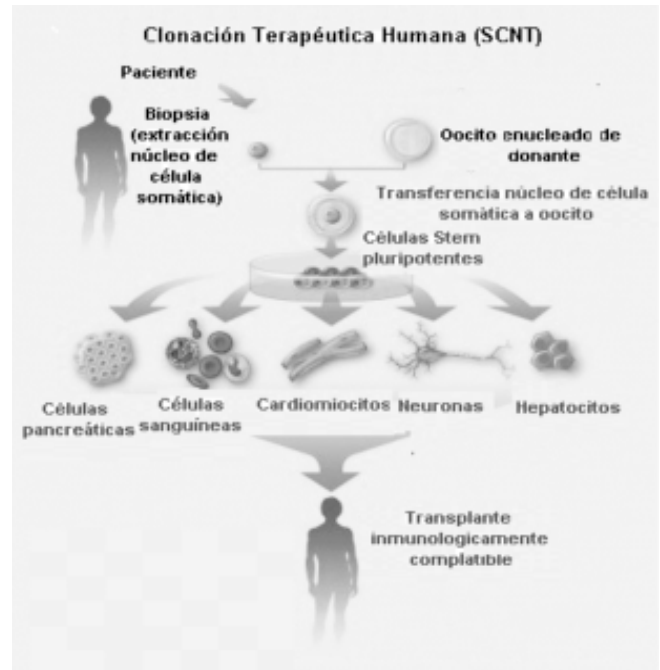


Figura 1. Perspectivas en la investigación con células stem en el área de la regeneración e ingeniería tisular. (Tomado de whyfiles.org/148clone_clash)

Las células stem pueden diferenciarse en cualquier fenotipo celular, ya que poseen un elevado potencial de proliferación manteniéndose al mismo tiempo en un estado indiferenciado. Estas propiedades explican la importancia de las células stem en ciencias básicas biomédicas, en la medicina regenerativa e incluso en biotecnología para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas como aquellas basadas en trasplantes análogos de tejidos o biomiméticos.

La utilización clínica de las células stem permitiría cubrir la creciente necesidad en el área de trasplantes celulares. De ese modo, los bancos de células stem dedicados a la criopreservación, permitirán al clínico y/o al investigador fácil y permanente acceso a poblaciones celulares bien definidas. Estas células podrán diferenciarse de acuerdo a las necesidades fisiológicas del paciente para formar líneas celulares específicas, es decir: neuronas dopaminérgicas para pacientes con enfermedad de *Parkinson*, células *beta de langerhans* para pacientes con diabetes juvenil, y cardiomiocitos para aquellas personas que han sufrido de infarto al miocardio, entre otros.



Figura 2. Células stem embrionarias (ESCs), originadas de la fertilización de un ovocito, donde se observa formación del blastocisto en cuyo interior se localiza una masa celular interna para luego comenzar la diferenciación a diversas líneas celulares. (Tomado de www.virtuallaboratory.net)

Clasificación de las células stem

Las células stem se han clasificado según su potencial de diferenciación, en: 1) totipotenciales (del latín *totus*, que significa completo) hace referencia al potencial que tienen estas células de generar un embrión completo (tejido embrionario y extraembrionario); 2) pluripotenciales, (“Pluri” del latín *plures*, que significa muchos o varios) que pueden dar origen a progenitores que forman cualquiera de las tres capas germinales embrionarias: mesodermo, endodermo y ectodermo; pero para incluirse dentro de esta categoría una única célula debe ser capaz de diferenciarse en progenitores especializados procedentes de cualquier capa embrionaria; además, demostrar funcionalidad de las células diferenciadas tanto *in vitro* como *in vivo* y producir un asentamiento claro y persistente en el tejido blanco (24, 76); 3) multipotenciales las cuales pueden dar origen a precursores relacionados solamente con una de las tres capas embrionarias; y por último 4) unipotenciales (del latín *unus*: uno) ó células que solo pueden generar

otras células hijas que se diferencian a lo largo de una única línea celular (24, 76).

En los animales superiores, las células stem se han clasificado en dos grupos. Por un lado, las *células madre embrionarias* (*embryonic stem cells* o *ECS's*), originadas de la masa celular interna del embrión en estadio de blastocisto (7-14 días), estructura a partir del cual se originarán las tres capas que darán origen a todos los tejidos del cuerpo humano: ectodermo, mesodermo y endodermo (12). Estas células son capaces de generar los diferentes tipos celulares del cuerpo, por ello se llaman células pluripotenciales, pues conservan el potencial de formar tejidos diferenciados lo que serviría para aplicaciones terapéuticas en múltiples enfermedades. De estas células se derivaran otras múltiples divisiones celulares, las *células madre órgano-específicas*, estas células multipotenciales, son capaces de originar las células de un órgano en el embrión y en el individuo adulto (23).

Las células stem adultas, son células indiferenciadas que pueden estar presentes en tejidos diferenciados con propiedades de autorrenovación. Se conoce desde hace décadas que son capaces de especializarse en células idénticas a las del tejido de origen (28). Generalmente se dividen y producen células progenitoras o precursoras que se diferencian en células con características y funciones especializadas idénticas a las de las células de un tejido específico. Existen en diferentes tejidos como médula ósea, sangre y cerebro. Los estudios han sugerido que son muy versátiles y tienen la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares (73, 74).

Dentro de estas células adultas encontramos las células stem hematopoyéticas (HSCs), las células stem de origen mesenquimatoso (MSCs), y células de la sangre y la gelatina de Warthon del cordón umbilical humano (28) Se ha comprobado que éstas células cultivadas y sometidas a ambientes humorales distintos pueden *transdiferenciarse*, es decir diferenciarse y dar origen a otros tipos celulares (8).

Propiedades de las células stem

Los principales parámetros o propiedades que permiten clasificar las células stem como tal, están sujetos a una amplia variación y dependen en cierto grado de la presencia de estas células *in situ* o en circunstancias experimentales, es decir *in vitro*. Son básicamente tres propiedades que caracterizan a las células stem (14, 17, 19):

- Auto-renovación (*self renewal*); definida como la capacidad de generar al menos una célula hija con características similares a la célula de origen (14, 17, 19).
- Potencial de diferenciación; la capacidad de una célula para diferenciarse en múltiples linajes, dicho de otro modo, el potencial para modificar el fenotipo de la célula de origen en distintos tipos celulares al tejido de origen y al menos en un tipo celular diferente al tejido de origen (14, 17, 19).
- Reconstitución funcional *in vivo* de un tejido en particular, lo que significa la diferenciación funcional *in vivo* en células del tejido de origen embrionario y al menos en un tipo celular de un tejido diferente al tejido de origen embrionario inicial (14, 17, 19).

La mayoría de las células stem adultas en teoría satisfacen esos 3 criterios fundamentales, a pesar que el grado de auto renovación y el potencial de diferenciación es menor que el observado para las células stem embrionarias (62).

Moléculas asociadas a la autorenovación.

Se han identificado genes que son necesarios para que las células stem se puedan renovar por si mismas, entre ellos están los genes Wnt, Hedgehog y Notch (75). Existe además, el gen denominado *unpaired (upd)*; que se expresa en la fuente (hub) de estas células y permite activar la cascada de señalización Jak- STAT que posee promotores de auto- renovación. Cuando esta vía es utilizada, se activan factores de transcripción que controlan la síntesis de otros genes permitiendo la regulación de cambios en el patrón celular.

En las células embrionarias de ratón, la propagación de estas células depende de la presencia del *factor inhibidor de leucemia* (LIF) este es un receptor de superficie celular que permite activar señales de traducción (66). LIF estimula las capas de células embrionarias y fibroblastos; y/o es una proteína recombinante, que forma un complejo de receptores heterodiméricos que contienen dos moléculas relacionados a complejos de citoquinas.; el receptor LIF (LIFR) y gp130; este se activa en asociación al receptor Janus Tirosina cinasa (JAK). LIF estabiliza en asociación con LIFR y gp130 receptores de citoquinas. La activación resultante de los receptores asociados a JAK quinazas causan la fosforilación y dimerización de STAT. Los dímeros son translocados en el núcleo, donde controlan la transcripción de los genes que regulan la auto-renovación. Los signos de transducción y activación de la transcripción (STAT) son una familia de factores de transcripción que unen receptores para la activación de JAKs. La fosforilación y activación de STAT es esencial para la auto renovación de las células ES; la expresión de una molécula STAT mutante, promueve la diferenciación (67).

Se piensan que las células más cercanas a la fuente o “hub” reciben altos niveles de *unpaired* para activar STAT, generando la expresión de genes específicos de la célula stem. En contraste, las células que se encuentran distantes de su fuente no producen la activación de *unpaired* para estimular STAT e instantáneamente ellas se diferencian (64).

En el 2002, se descubrió el gen denominado *HOXB4* el cual junto con el *gen Notch* está involucrado en la producción de células stem hematopoyéticas. En este reporte, los investigadores lograron obtener la expansión de células stem hematopoyéticas hasta 40 veces, determinando que el mecanismo mediante el cual el *HOXB4* participó en la expansión, fue por la expresión de los genes *NOD/SCID*, activados por la vía de Wnt (̂ - Catenina), concluyendo que el papel de este gen es crítico, lo que genera grandes esperanzas en su desarrollo

para aplicaciones terapéuticas, en especial en cáncer (31, 65).

Moléculas asociadas a la diferenciación.

Durante el proceso de diferenciación de las células stem se activan factores de transcripción que van a realizar interacciones con otros factores derivados de las células del nicho, así como estos factores son capaces de controlar la auto renovación también pueden controlar el destino, cada linaje está controlado por la combinación determinada de estos factores los cuales se pueden expresarse de forma diferente (77).

En estudios recientes realizados en ratones, se ha observado que los factores *SCI/Tal-1* son esenciales en la formación de todos los linajes celulares de la hematopoyesis. (77), En epitelio intestinal y epidermal, se han reportado factores como *Tcf/Lef* que son activados por la vía de la β -Catenina. El factor *Tcf-4* es mediador de señales que permiten la formación y el mantenimiento de las criptas intestinales (nicho intestinal). Mutaciones en la β -catenina producen complejos *Tcf-4 / β -catenina* constitutivamente lo cual acelera la proliferación de las células madre (60, 77))

Se ha reportado, que durante el desarrollo embrionario se presenta expresión de la molécula *Zac-1* en células stem progenitoras, con expresión muy amplia e intensa en las diversas matrices germinativas (zonas de alta actividad mitótica), concretamente a lo largo del tubo neural y en los diversos neuroepitelios cerebrales. Entre E12 y E18, muchas células *Zac1*-positivas, localizadas en la capa celular más interna del lumen del tubo neural, expresan *Nestina* (proteína de los filamentos intermedios del tipo VI, que se expresa en las células madre/progenitoras del neuroepitelio más primitivo) y *GFAP* (proteína de los filamentos intermedios de la clase-III, que se encuentra expresada en las células madre/progenitoras neurales (78-80).

Además, muchas de las células ventriculares y subventriculares que expresan *Zac1* también expresan *PCNA*, la cuál se acumula durante la fase G1 del ciclo

celular, alcanza su máximo durante la fase S y baja sus niveles durante la fase G2/M (81), mientras que algunas células *Zac1*-positivas en la zona ventricular y en el tubo neural expresan *FORSE-1*, que marca regionalmente subpoblaciones específicas de células progenitoras del sistema nervioso central durante el desarrollo embrionario (82).

Nichos de las células stem

En reportes recientes se han caracterizado pequeñas zonas donde reside el control de la actividad de las células Stem en los diferentes órganos del cuerpo (60). Se ha sustentado que las células stem son controladas por un medio ambiente único y específico denominado "nicho". Gracias a estudios recientes se ha empezado a unificar el concepto de la regulación celular y molecular de éstas células (60).

El nicho es un mecanismo mediante el cual se regula la división y la diferenciación. En donde las células del nicho bordean la membrana basal señalizan las células stem para bloquear la diferenciación y regular la división. Cuando un linaje prevalece (células pobremente mitóticas) las células stem se dividen y una de las células hijas mantiene la conexión con el nicho, mientras que la otra llega sola y comienza a diferenciarse. Cuando prevalece el mecanismo de una población (células altamente mitóticas). La división celular puede ser simétrica o asimétrica según lo determinen los factores locales y la matriz extracelular MEC (Figura 3).

Se ha estudiado durante los últimos años acerca de la identificación de nichos, aunque primero deben ser identificadas las células stem y sus marcadores específicos para luego determinar el medio ambiente en que reside y sus interacciones con las demás células, factores locales y MEC. Un nicho puede persistir aún en ausencia de células stem residentes y regular la actividad de células exógenas competentes. En contraposición, el destino de las células que se separan es irrelevante para el nicho(60)

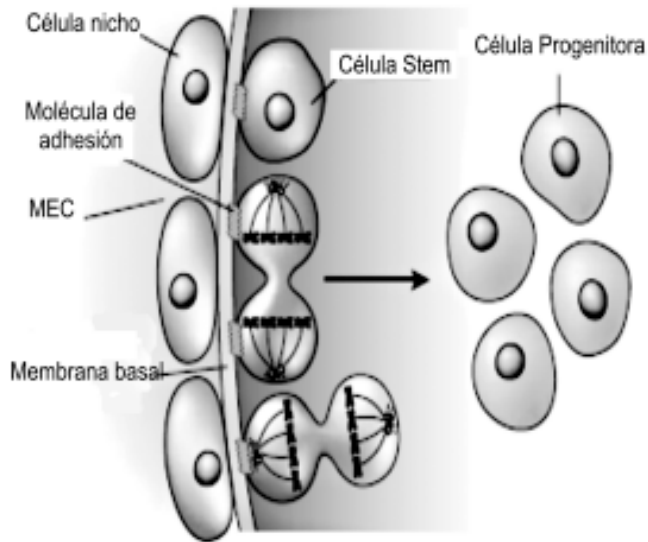


Figura 3. Estructura del nicho. Las células del nicho que bordean la membrana basal mediante moléculas señal bloquean la diferenciación o regulan la división de células stem (Tomado de Nature, 2001. 414)

Es así como las células stem aparecen cuando el nicho adquiere la capacidad de “secuestrar”, preservar y controlar las células embrionarias indiferenciadas que presentan un medio ambiente con las características requeridas. El nicho posee propiedades reguladoras y vías de señalización importantes para definir el destino celular. Estos nichos se pueden encontrar en diferentes tejidos específicos en donde las células stem son reconocidas por marcadores, dependiendo del linaje. Cada una de estas células, es localizada por vías de señalización intramolecular y factores locales en la MEC, actuando por dos mecanismos básicos: 1) un linaje específico, en donde hay divisiones de células stem específicas, por ejemplo, una célula stem en el nicho encuentra contacto con el estroma; esta se localiza asimétricamente y orienta su división para asegurar que sólo una hija herede la característica de célula nicho y se fije en ese microambiente celular, 2) si continúa la división celular una nueva célula hija adquiere información sobre- heredada y se relocaliza, al alejarse de las células estromales y sus señales, se dirigen a diferenciarse. Estos dos mecanismos pueden ser diferentes dependiendo del linaje (60).

Plasticidad de las células stem

En los últimos años, han sido publicados diversos artículos en los cuales se demuestra que las células stem aisladas de varios tejidos cuentan con una capacidad de diferenciación en células maduras de un tejido distinto al de origen; propiedad que ha sido denominada “*plasticidad de células stem*” (19). Figura 4.

La mayoría de estudios han sido realizados en modelos animales (murinos) y en muy pocos se han empleado células humanas. Gran parte de estos trabajos fueron realizados con base en trasplantes *in-vivo* de células marcadas genéticamente, en donde la detección de células donantes fue realizada con la identificación de la presencia del cromosoma Y o en la del gen marcado (2, 19).

Al analizar los resultados de dichos estudios, podemos decir que la plasticidad de las células stem *in vitro* depende de las características fenotípicas de las células obtenidas, para así poder definir el estado de diferenciación en otras células diferentes al tejido de origen. Sin embargo, aun no se logra demostrar que esas células diferenciadas obtenidas posean características funcionales iguales a la línea celular descrita. Finalmente, en otros estudios se realizaron trasplantes tanto a partir de poblaciones celulares no purificadas como de células purificadas hasta obtener una homogeneidad parcial; razón por la cual fue imposible evaluar el origen (a partir de un clon de células stem) de las células diferenciadas y de las células con características de un segundo tejido.

Plasticidad de células hematopoyéticas de la Medula ósea.

Cerca del 80% de los estudios que reportan la plasticidad de las células stem adultas se realizaron con medula ósea, o bien con sangre periférica o medula ósea enriquecida. Para células stem hematopoyéticas se reportó la diferenciación de las mismas en células hematopoyéticas diferenciadas; pero al mismo tiempo en células con características de músculo esquelético,

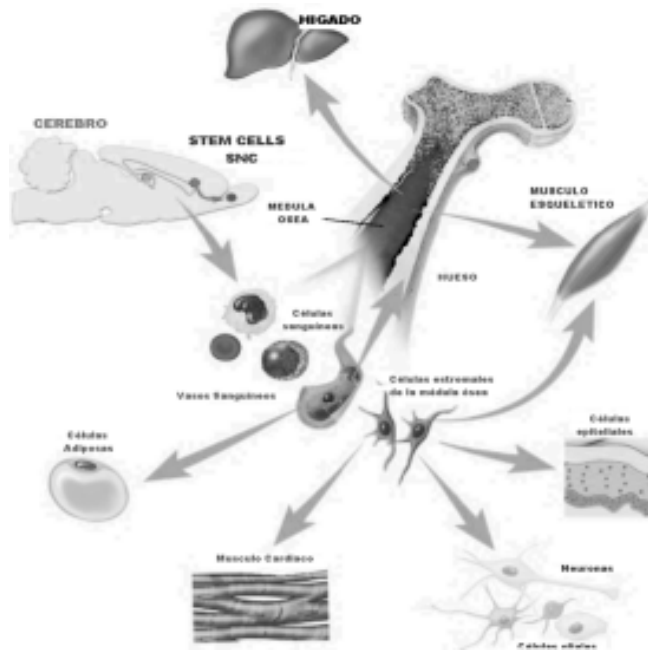


Figura 4. Diferenciación de células stem adultas (ASCs). Las ASCs pueden dividirse indefinidamente y generar distintos fenotipos celulares con funciones propias de cada tejido. (Tomado de Stem cells basics. www.nih.gov).

músculo cardíaco, endotelio, neuroectodermo, epitelio y células endodérmicas como: hepatocitos, epitelio gastrointestinal, y epitelio pulmonar. En todos esos estudios, en donde se transplantaron células de sangre periférica o de médula ósea, no se realizaron cultivos *in vitro*, por lo cual no se logró determinar si las células que poseían plasticidad celular podían experimentar auto-renovación (19).

Además se reportó que en trasplantes de poblaciones celulares mixtas obtenidas de animales “wild type” ó de animales transgénicos se detecta por coloración de X – Gal el gen de la *Beta galactosidasa* o el gen marcado con la proteína verde fluorescente incrementada (eGFP). Incluso en otros estudios donde se emplearon células stem hematopoyéticas enriquecidas se logró la formación de células hematopoyéticas y de hepatocitos a partir de injertos o trasplantes de múltiples células. Por lo tanto, el criterio de diferenciación en múltiples líneas celulares no se ha analizado hasta el momento.

La excepción se aplica a los trabajos publicados por Krause y col (29), porque se aislaron las células CD34+Sca1+ que experimentaron “homing”, se

transfirieron a un segundo receptor para demostrar la diferenciación en células hematopoyéticas y epiteliales. De hecho, las células stem hematopoyéticas transplantadas dieron origen a células localizadas en el endotelio de la retina y a células hematopoyéticas derivadas del mismo progenitor.

Los estudios que definen la plasticidad basados en la adquisición de características morfológicas y fenotípicas de tejidos no hematopoyéticos, deben demostrar que cumplen con el criterio denominado diferenciación funcional *in vivo*, pues el grado de colonización de las células stem en los tejidos no hematopoyéticos presenta un porcentaje bajo. Entonces, con tan solo la adquisición de las características fenotípicas, como la expresión de distrofina y de albúmina, no se puede demostrar la funcionalidad de las células individuales transplantadas.

Los estudios efectuados por Lagasse y su equipo (29) demostraron el reemplazo por hepatocitos funcionales posterior a la inyección sistémica de células de médula ósea murina enriquecidas con células madre hematopoyéticas. Un estudio realizado por Orlic y colaboradores (24) demuestra en un modelo murino de isquemia del miocardio, que el trasplante de células stem hematopoyéticas enriquecidas en el área infartada permite la colonización de las células derivadas de la médula ósea que presentan características de cardiomioblastos (cardiomiocitos inmaduros). En este estudio, se demostró una significativa mejora en la función cardíaca.

Plasticidad de células stem mesenquimatosas de la médula ósea.

La médula ósea contiene células stem hematopoyéticas y también células stem *mesenquimatosas*, que pueden cultivarse *in vitro* durante varios pasajes e incluso pueden diferenciarse en células de tipo mesodérmico como; osteoblastos, condroblastos, adipocitos, fibroblastos y mioblastos esqueléticos. Incluso, las células stem mesenquimatosas logran diferenciarse *in vivo* en el mismo tipo de células. Así mismo, reportes recientes

nos muestran que las células stem mesenquimatosas pueden adquirir características distintas al origen mesodérmico como células endoteliales, neuroectodermo y endodermo.

En algunos estudios, se demostró que las células stem con plasticidad tienen una actividad de auto renovación. Para demostrar la diferenciación en múltiples líneas celulares a partir de una célula Stem, se analizó la derivación clonal de la progenie diferenciada, mediante diversas estrategias que permiten aislar la progenie celular como:

- *Ring - cloning*: enfoque experimental que no demuestra totalmente que las células stem originan una progenie múltiple, porque las células stem mesenquimatosas son bastantes móviles en cultivo por lo cual varias células individuales podrían contribuir a formar la colonia aislada en un anillo (ring) determinado.
- *Estrategias de asilamiento de células únicas.*
- *Estrategias de marcaje retroviral*

Pocos estudios, han analizado la funcionalidad de células diferenciadas en otro tipo de linaje celular distinto al mesodermo.

Reyes y col. (68) describieron células stem progenitoras adultas que se diferenciaron bajo la presencia del factor de crecimiento endotelial vascular VEGF, en células con morfología y función similar a células endoteliales *in vitro* e *in vivo*. Otro estudio realizado por Schwartz y su grupo nos muestra como las células stem multipotentes adultas se diferenciaron en presencia del factor de crecimiento fibroblástico 4 (FGF 4) y de factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) en células hepáticas que secretan albúmina, urea y demuestran actividad del citocromo p-450 inducida por fenobarbital. Del mismo modo, los estudios que demuestran que las células stem mesenquimatosas se diferencian en células con morfología y fenotipo de neuronas y glia, deben además probar que esas células poseen características electro fisiológicas de neuronas.

Plasticidad de otros tejidos.

Además de las demostraciones de la existencia de plasticidad en las células derivadas de medula ósea, esta propiedad de las células stem se ha descrito incluso en células derivadas de otros órganos como el músculo y el tejido nervioso. Jackson y colaboradores (40), reportan el transplante de células musculares o de células *satélite* (*side population cells*), que dan origen *in vitro* a células hematopoyéticas después de irradiación para lograr depleción total. Otro investigador, denominado Gussoni (69); demostró que las células satélite del músculo pueden reconstituir el sistema hematopoyético en ratones irradiados letalmente. Sin embargo, estudios posteriores realizados por Kawada y su equipo (70), consideraron la aparente plasticidad de las células musculares por la presencia de células hematopoyéticas en el tejido muscular. Existen publicaciones científicas como las del grupo de Bjornson y el de Shih (71) en las cuales se demuestra que las células stem nerviosas murinas cultivadas *in vitro* durante varios pasajes pueden diferenciarse en células hematopoyéticas.

En ambos estudios se logró establecer el primer criterio para considerarlas como células stem, a pesar de no haber realizado marcaje retroviral o asilamiento de células únicas para demostrar en realidad que las células obtenidas dentro de las esferas neurales se derivaron de una célula stem. Tampoco se presentaron resultados en los cuales se hubieran tratado animales con aplasia medular; ni utilizaron ensayos de repoblación competitiva para demostrar la función *in vivo* de células hematopoyéticas.

De otra parte, Toma y col (72) describieron unas células aisladas de dermis de ratón y humano cultivadas durante varios meses, que se diferenciaron en células con características fenotípicas de neuronas y glia, así como adipocitos y músculo liso *in vitro* (48).

Explicaciones posibles sobre plasticidad.

Hasta el momento, se mencionan cuatro posibles teorías sobre la plasticidad descrita para las células stem.

1. Las células stem migran y se encuentran en diferentes tejidos que no están relacionados unos con otros. Se han visto células stem hematopoyéticas (HSC) en músculo; también se observan células ovals en médula ósea. Un tipo de linaje no es el que causa la diferenciación de las células stem (una célula madre no es que causa toda la diferenciación en un linaje). La presencia de múltiples células madre en diferentes tejidos son las que permiten la plasticidad.
2. Se detecta plasticidad cuando hay una fusión de células transplantadas con células de un huésped de diferente linaje; ocurre transferencia de información genética de la célula transplantada a la célula derivada del huésped. En diferentes estudios, cocultivaron células stem embrionarias (ES) con células adultas. La información genética de las ES fue transferida a la célula adulta (53,54); este fenómeno es raro y ocurre en condiciones especiales dando como resultado células que son tetraploides. No se han publicado estudios que aclaren que el fenómeno de plasticidad se presente o provenga a partir de la transdiferenciación. Algunas circunstancias en donde se puede ver el mecanismo en condiciones selectivas que permitan la diferenciación de estas células, se encuentran donde la plasticidad es vista en tejidos que “toleran” tetraploidias como miocitos, hepatocitos y células de Purkinje y otras en donde la frecuencia de transdiferenciación se encuentra disminuida. En los estudios, Ying y col (58) y Terada y col (57), no se logró demostrar como es el fenómeno de fusión celular in vivo, en donde se describen la mayoría de fenómenos de plasticidad.
3. Esta teoría surge desde la clonación de la oveja Dolly (59) indicando que una célula adulta de una

especie mamífera, puede ser reprogramada para adquirir capacidad pluripotente cuando se introduce su núcleo dentro del citoplasma en un óvulo no fertilizado. La de-diferenciación y re-diferenciación se piensa que ocurre en anfibios y peces para regenerar sus miembros espontáneamente. Se detecta plasticidad por vía de rediferenciación o vía de reprogramación nuclear. Las células stem que son más diferenciadas experimentan reprogramación genética cuando son removidas de su hábitat natural y son introducidas, dentro de un nuevo microambiente celular.

Hay cambios que se desconocen en factores del citoplasma del embrión que reprograman el núcleo de la célula somática del donante durante un trasplante nuclear.

Los mecanismos moleculares que ocurren en la reprogramación nuclear son los que permiten inducir la plasticidad y el linaje. Se cree que en anfibios y peces cuando han perdido una parte de su cuerpo, las células del blastoma se diferencian o rediferencian para generar muchos y variados tipos celulares que se requieran para la construcción de un nuevo tejido o parte de este (10).

La vía de señalización de los receptores de ácido retinóico y Sonic Hedgehog (Shh) juegan un papel importante en la reprogramación genética requerida para esta formación. Los genes específicos homeobox y junto con el gen *msx1* están relacionados en la de/re diferenciación, cuando se inducen o se expresan en líneas celulares mamíferas.

Aislamiento y caracterización de células stem

Durante las últimas décadas se han venido desarrollando y perfeccionando los métodos de aislamiento de células stem pluripotenciales; se han utilizado células derivadas de tejido fetal de cadáver y otras obtenidas de embriones. El aislamiento de este tipo de células stem, ha demostrado que poseen características muy semejantes en sus capacidades

básicas aunque con sutiles diferencias. No se ha establecido de manera contundente cuál de ellas ha tenido mejor comportamiento clínico.

Marcadores de células stem

En los últimos años, las investigaciones han arrojado descubrimientos acerca de la existencia de células stem en diferentes tipos de tejidos; esto hace pensar en una técnica que permita detectar este tipo de células.

Una célula stem se puede encontrar en 100.000 células adultas circulando en sangre, además de que estas morfológicamente son indiferenciadas. Sin embargo, gracias a los marcadores moleculares se ha facilitado el trabajo en el laboratorio de investigación para la detección de estas células. Los tipos de marcadores que se utilizan, son específicos de la célula y se encuentran en su superficie celular.

Estos marcadores, *in vivo* codifican para proteínas especializadas que actúan como receptores y tienen la capacidad de señalización o adhesión. Hay muchos tipos diferentes de receptores que difieren en estructura y afinidad. Normalmente estas células usan estos receptores, como vía de señalización con otras células y responder a señales extrínsecas; estos receptores celulares actúan como marcadores de células stem.

Cada tipo de célula como por ejemplo las células hepáticas tiene ciertas combinaciones de receptores en su superficie lo que la hace distinguible de otros linajes celulares. Los tres tipos de células stem mejor caracterizados son las células stem embrionarias (ESCs), neurales (NSCs) y hematopoyéticas (HSCs). Pero células como las de intestino, piel, músculo e hígado no han podido ser identificadas exactamente. Se han detectado más o menos 600 genes expresados en ESCs, NSCs y HSCs mediante ensayos de ADN e hibridización. Se han detectado para ESCs la presencia de 1787 genes y la presencia de diferentes marcadores (62) Tabla 1.

Para identificar los marcadores de las células stem se usan nombres cortos basados en moléculas que están unidas a los receptores de superficie de la célula. Por

ejemplo, el receptor celular que se encuentra cerca al antígeno 1 en su superficie es identificado como Sca-1 (antigen stem cells 1). Para identificar un tipo de célula Stem, se utiliza la combinación de varios marcadores celulares que reflejan la presencia (+) o ausencia (-); un ejemplo de esto, es un tipo de célula Stem derivada de médula ósea llamada “*Side Population*”, se describe como (CD34 low/-, c-kit+, Sca-1 +). Las células con características pluripotentes persisten después del desarrollo embrionario; las ES pluripotentes se pueden identificar por el factor de transcripción oct-4. Este gen es expresado en la pregastrulación de embrión, y es un receptor de células embrionarias de la masa celular interna del blastocisto y el carcinoma de células embrionarias (62).

Por muchos años, se han desarrollado varias técnicas para la señalización de estas moléculas; estas se basan en detectar el marcador específico por medio de un componente fluorescente que es activado en presencia de un haz de luz ultra violeta. La técnica de FACS (fluorescent activate cells sorting) utiliza un instrumento que permite la suspensión de miles de células marcadas en donde se hacen pasar por un agujero pequeña célula por célula; luego estas son atravesadas por una luz láser que excita las moléculas fluorescentes, unidas a los marcadores específicos, produciendo una señal eléctrica que es procesada por un software generando una gráfica en donde identifica la población de células detectadas dependiendo de su carga eléctrica. Otra técnica, es la identificación de genes y factores de transcripción estos son únicos en las células stem. Para esto, se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), que detecta la presencia de genes que son activos y juegan un papel en la especialización de la célula. Estos se conocen como marcadores genéticos.

Recientemente, los nuevos avances en ingeniería genética utilizan la fluorescencia pero no dependiente de marcadores de superficie. La importancia de esta nueva técnica es que permite ver el camino de la célula stem a una célula diferenciada o especializada. Esta

Tabla 1. Algunos marcadores utilizados para la identificación de células stem. Los genes y marcadores detectados pueden ser utilizados para identificar células stem en poblaciones aisladas, aunque es necesario establecer las regiones genómicas que regulan su expresión para en un futuro poder entender como se realizan las conexiones reguladoras utilizadas por las células stem.

Tipo de célula	Marcadores específicos	FUNCION
Endotelio	Fetal liver kinase-1 (FK-1) Smooth muscle cell specific myosin heavy chain	En el vaso sanguíneo, es un receptor de superficie celular, proteína que identifica células endoteliales precursoras, marcador de contacto célula- célula. Identifica músculo liso y vasos sanguíneos.
Osteoblasto	Bone specific alkaline phosphatase (BAP). Osteocalcina	Enzima expresada en el osteoblasto indica la formación ósea. Proteína mineral únicamente sintetizada por el osteoblasto.
Mesenchymal stem cell y progenitor cells	Bone morphogenetic protein receptor (BMPR)	Importante para la diferenciación de células stem mesenquimales y progenitoras. BMPR identifica linajes mesenquimales específicos tempranos.
Hematopoiético stem cells (HSC), y progenitoras endoteliales	CD34 CD34, Sca1	Proteína de superficie celular de médula ósea indicadora para HSC y progenitores endoteliales Identifica MSCs puede marcador de diferenciación para adipocitos, osteocitos, condrocitos y miocitos.
Mesenchymal stem cells (MSC) HSC, MSC	c-kit	Receptor de superficie celular de médula ósea; identifica HSC y MSC, vinculado con en la estimulación de células con suero fetal bovino permitiendo la proliferación de ES, HSC y MSC.
Astroцитos	Glial fibrillary acid protein (GFAP)	Proteína específica producida por el astrocito
Progenitor neural	Nesina Oct-4	Proteína estructural filamentosa expresada en tejido neural primitivo Factor de transcripción único en pluripotencial Stem cells (PSCs) esencial para la estabilidad y mantenimiento de las PSCs indiferenciadas
Pluripotent Stem cells (ES, HSC, MSC)	Stem cell Factor (SCF) o c-kit ligando Telomerasa	Proteína de membrana que permite la proliferación de HSCs, MSCs Enzima asociada con la inmortalidad e líneas celulares, usada para la identificación de PSCs

técnica, consiste en insertar un “gen reportero” llamado *green fluorescent protein* (GFP)² o proteína fluorescente verde. Este gen solo es activado cuando las células son indiferenciadas y comienzan a especializarse, al ser activado este gen en el momento de la diferenciación emite un color verde. Las limitaciones de esta técnica es que se puede marcar otro tipo distinto de células que aún no a han sido estudiada o identificada. Por ende, el uso de marcadores continúa siendo el mejor método en el mundo de la biología celular. Existe diversidad de marcadores específicos dependiendo del tipo de célula Stem que se quiera identificar Tabla 1.

Las células stem despiertan la promesa de regenerar las partes del cuerpo lesionadas o que presenten alteraciones irreversibles e incluso para tratar enfermedades que desafían los tratamientos farmacológicos. Los pacientes hoy en día están impresionados por los reportes de las células con propiedades casi milagro-

sas, pese a que muchos estudios científicos publicados han sido refutados posteriormente, e incluso otros datos se han distorsionado a medida que se generan debates sobre la posibilidad de derivar algunas de estas células aisladas de embriones humanos.

Conclusiones

Las células stem se consideran importantes para estimular la regeneración de los tejidos en el individuo adulto. Ampliar el conocimiento sobre la biología de las células stem, específicamente de los mecanismos moleculares y celulares involucrados en las propiedades de auto renovación y diferenciación es imprescindible para su uso en medicina regenerativa e ingeniería de tejidos, lo que abre la prometedora posibilidad de ser utilizadas como estrategias terapéuticas específicas para reemplazar tejidos afectados de

acuerdo a las necesidades fisiológicas del paciente en particular. Todavía existen conflictos bioéticos, religiosos y políticos, además de obstáculos técnicos por superar e interrogantes científicos que resolver antes de empezar a utilizar las células stem para aplicaciones terapéuticas de manera exitosa en el ser humano. Por estas razones es importante continuar con los estudios e investigaciones con el fin de ampliar el conocimiento acerca de la biología de estas maravillosas células.

Referencias

- Aristotle. *Historia Animalium*. Vol I. Peck A. L. Translator. Cambridge: Harvard University Press; 1965.239 p.
- Odelberg S. Unraveling the molecular basis for regenerative cellular plasticity. *PloS Biol*. 2004; (8): 1068 - 1071.
- Kumar A, Velloso C, Imokawa Y, Brookes J. Plasticity of retrovirus labelled myotubes in the new limb regeneration blastema. *Dev Biol*. 2000; (218): 125 - 136.
- Thomson J, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S, Watniz S, Swiergiel J, Marshall V. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*.1998; (282): 1145 - 7.
- Edwards B, Gearhart J, Wallach E. The human pluripotent stem cell: impact on medicine and society. *Fertility and Sterility*. 2004; (74).
- Lanza R, Rosenthal N. The Stem cell challenge. *Scientific American*. 2004;(06): 61 - 67.
- Shamblott M, Axelman J, Wang S, Bugg E, Littlefield J, Donovan P. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; (282): 1145 - 7.
- Rossant J, Papaioannou. The relationship between embryonic, embryonal carcinoma and embryo derived stem cells. *Cell Differentiation*. 1984; (15): 155 - 161.
- Byoung M, Masako M, Gronthos S, Bartold P, Batouli S, Young M, Geron P, Wang C, Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet*. 2000; (364): 149 - 155.
- Goldberg M, Six N, Decup F, Bourd K, Palmier K, Salih E, Veis A, Lasfargues J. Mineralisation de la pulpe dentaire: apports de l'ingénierie tissulaire aux thérapeutiques de demain en odontologie. *Pathol Biol*.2002; (50): 194 - 203.
- Paul H. Dental and skeletal stem cells: Potential cellular Therapeutic for craniofacial regeneration. *J. of dental education*. 2002; 66 (6): 766-773.
- Edwards B. Stem cells today: A. origin and Potential of embryo stem cells. *Reproductive BioMedicine on line*. 2004; 8(5) 275 - 306.
- Gronthos S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS*.2000; 97 (25): 13625-13630.
- Gronthos S. *et al.* Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J. Dent Res*. 2002; 81 (8): 531-535.
- SHI S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone*. 2001; 29 (6): 532-539.
- Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey P. G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology and potencial applications. *Stem Cells*. 2001;(19):180-192.
- Fuchs E, Segre J. Stem cell: a new lease on life. *Cell*.2000;(100): 143-155.
- Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Geronh R and Shi. S. Posnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *PNAS*. 2000 (97): 25: 13625-13630.
- Verfaillie, C. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *TRENDS in Cell Biology*. 2002; 12(11): 502-508.
- Munévar J, Acosta L, Galindo L. D, Mondol I, Mejía A, Foreiro J. El interes de las células stem y sus aplicaciones en Odontología. *Revista científica, Facultad de Odontología, Universidad El Bosque*. 2003; 9 (2): 92 - 100.
- Avila L, Munévar J, Acosta L, Madero J. Las células stem de cordón umbilical como alternativa a las células stem de origen embrionario. *Controversias en Ginecología y Obstetricia*. 2002; 13(72): 1832 - 1840.
- Munévar J, Castellanos J, Martínez M, Acosta L, Hurtado H, Lafaurie G. Immunocytochemical characterization of Mesenchymal Stem cells from de human umbilical cord. *In vitro cell animal biology*. Submitted.2005.
- Munévar Juan Carlos. Potencial terapéutico de las células stem en odontología. *Tribuna Odontológica*.2005; 2(2): 44 - 48.
- Orlic, D, Kajstura J, Chimrenti, S. Mobilized bone marrow cells repair the infracted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;98:10344-10349.
- Langer R. *Tissue Engineering*. Science. 1993 260 (5110):920-932.
- Wilmut I, Schnieke A, McWhir J, Kind A, Campell K. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*.1997;385: 810 - 813.
- Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz E, Melton D, Benvenisty N. From the cover: effects of eigh growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*.2000; 97: 1307 - 12.
- Harder F, Henschler R, Jungham I, Lamers M, Muller A. Human hematopoiesis in murine embryos after injecting human cord blood derived hematopoietic stem cells. *Blood*. 2002; 99: 719 - 21.
- Laggase E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L. Purified Hematopoietic Stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med*.2000; 6: 1229 - 34.
- Gluckman E, Broxmeyer H, Auerbach A, Friedman H, Douglas G, Devergie A. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's Anemia by means of umbilical cord blood from an HLA identical sibling. *N Engl J Med*.1988; 321: 1174 - 8.
- Madhambayan G, Rogers I, Casper R, Zandstra P. Controlling culture dynamics for the expansion of hematopoietic stem cells. *J Hematother Stem Cell Research*. 2001;10: 481 - 92.
- Nagatsu T. Parkinson's disease: changes in apoptosis related factors suggesting possible gene therapy. *J Neural Trans*. 2002; 109: 731 - 45.
- Gali R, Borello U, Gritti A, Minasi M, Bjornson C, Coletta M. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci*. 2000; 3: 986 - 91.
- Theise N, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei P, Morgan G, Teperman L. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*.2000; 32: 11 - 6.
- Hochedlinger K, Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature*.2002; 415: 1035 - 8.
- Betts D, Bordignon V, Hill J, Winger Q, Westhusin M, Smith L. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomerase length in cloned cattle. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 1077- 82
- Mann M, Bartolomei M. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. *Genome Biol*.2002; 3.
- Constantinescu S. Stemness, fusion and renewal of HSC and ESC. *J Cell Mol Med*. 2003;7(2):103-12
- Stem cell research - second update. The Royal Society, Policy document 0/01. London.2001.
- Ryynanen E, Tan E, Hoffren J. Type VII Gene Expression In Human Umbilical Tissue And Cells. *Lab. Invest*.1993; 69(3):300-304.

41. Caplan A. The mesengenic Process. Clinics in Plastic surgery. 1994; 21(3): 429, 435.
42. Pittenger M, Mackay A, Beck S. Multilineage potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. Science. 1999; 284.
43. Bruder S, Lawrence E, Haynesworth S. The generation of monoclonal antibodies against human osteogenic cells reveals embryonic bone formation in vivo and differentiation of purified mesenchymal stem cells in vitro. Trans Ortho Res Soc. 1995; 20: 8.
44. Oganessian A, Zhu Y, Sandell L. Type IIa procollagen amino propeptide is localized in human embryonic tissues. Journal of Histochemistry and Citochemistry. 1997; 45: 1469 - 80.
45. Dror R, Amir H, Nir C. Fibroblast Factor Receptor-3 as a Marker For Precartilaginous Stem Cells; Clin Orthop. 1999; 367: 163-175.
46. Dror R, Amir H, Avner Y, Zvi N. Mesenchymal cells and growth factors in bunions. Foot and Ankle International. 1999; 20: 727 - 32.
47. Hasharoni A, Robinson D, Hecht D, Dekel S, Halperin N, Yayon A, Nevo Z. Fibroblast Growth Factor Receptor 3 as a marker of mesenchymal precartilaginous stem cells which disappears in mature chondrocytes. Ortho. Bull. 1996; 16: 53-71.
48. Abraham, K, Givol D, Avivi A, Yayon A, Copeland N. Mapping of murine fibroblast growth factor receptors refines regions of homology between mouse and human chromosomes. Genomics. 1994; 21: 656-658.
49. Keegan K, Jonson D, Williams L, Hayman M. Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. Proc. Natl. Acad. Sci. 1991; 88: 1085-1099.
50. Gill P, Jarjoura D. Wharton's Jelly in the umbilical cord. A study of its quantitative variations and clinical correlates. Journal of Reproductive Medicine. 1993;38(8): 611 - 14.
51. Franc S, Rousseau J, Gorrene R. Microfibrillar Composition of umbilical cord matrix: Characterization of fibrillin, collagen VI and intact collagen V. Placenta. 1998; 19(1):9104.
52. Ghezzi L, Raio E, Di N, Franchi D, Balestreriv D. Nomogram of wharton's jelly as depicted in the sonographic cross section of the umbilical cord; Ultrasound. Obstet Gynecol. 2001; 18: 121-125.
53. Takechi, K, Kuwabara, Y, Mizuno, M. Ultrastructural And Immunohistochemical Studies Of Wharton's Jelly Umbilical Cord Cells. Placenta. 1993;14(2): 235-245.
54. Nanaev A, Kohnen G, Milovanov. A, Domogatsky K. Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord. Placenta. 1997; 18 :53-64.
55. Sobolewiski K, Bankowski E, Chyczewiski I, Jaworsky S. Collagen and Glicosaminoglicans of Wharton's jelly. Biol-Neonate. 1997;18(1):11-21.
56. Sittinger M. Tissue Engineering: artificial tissues replacement containing vital components. Laryngorhinologie. 1995; 74 (11): 695-9.
57. Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz D, Nakano Y, Meyer E, Morel L, Petersen B, Scott E. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. Nature. 2002; 416 (6880):542-5.
58. Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. Nature. 2002;416(6880):545-8.
59. Campbell K, McWhir J, Ritchie W, Wilmut. I Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. Nature. 1996;380(6569):64-6.
60. Spradling B, Drummond B, Kai B. Stem cells find their niche. Nature. 2001; (414): 98-104.
61. Stem S. Stem Cells: Scientific Progress and future research. NIH June. 2002.
62. Ramalho *et al.* "Stemness": Transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. Science. 2002; 298: 597-600.
63. Molofsky A, Pardal R, Iwashita T, Park I, Clarke M, Morrison, B. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cells self renewal from progenitor proliferation. Nature. 2003; 30(425):962-7.
64. Brawley C, Matunis E. Regeneration of male germline stem cells by spermatogonial dedifferentiation in vivo. Science. 2004; 28(304):1331-4.
65. Antonchuk J, Sauvageau G, Humphries R. HOXB4-induced expansion of adult hematopoietic stem cells ex vivo. Cell. 2002; 109: 39-45.
66. Smith, A. *et al.* Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. Nature. 1998; 336: 688-690.
67. Davis, S. *y col.* LIFRb and gp130 as heterodimerizing signal transduction of the tripartite CNTF receptor. Science. 1993; 260: 1805-1808.
68. Reyes M. *et al.* Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and the differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1999;96: 10711-10716.
69. Gussoni E, *et al.* (1999) Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. Nature. 401; 390-394.
70. Kawada H, Ogawa M. Bone marrow origin of hematopoietic progenitors and stem cells in murine muscle. Blood. 2001; 98: 2412-2422.
71. Bjorson C. *et al.* Turning brain into blood: a hepatopoietic fate adopted by adult neural stem cells *in vivo*. Science. 1999; 283:354-357.
72. Toma J, *et al.* Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. Nat. Cell. Biol. 2001; 3: 778-784.
73. Kaderit, S. International Society of Stem Cells research. 2003.
74. The official National Institute of Health Source for stem cells research. The Adult Stem cell. Stem cells Basics. 2004; 43 - 58 p.
75. Reya T, Morrison S, Clarke M, Weissman I. Stem Cells, cancer, cancer and stem cells. Nature. 2001; 414:105-111.
76. Rodriguez V. Células madre: Conceptos generales y perspectivas de investigación. Universitas Scientiarum. 2005; 10(1): 5 - 14.
77. Giraldo J, Madero J, Avila M, *et al.* Stem cells. Rev Colomb Obstet Ginecol. 2003;54(2):87-96.
78. Doetsch F, Caille I, Lim D, García J, Alvarez, A. Subventricular Zone Astrocytes Are Neural Stem Cells in the Adult Mammalian Brain. Cell. 1999; 97: 703-716.
79. Alvarez A, Seri B, Doetsch F. Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain. Brain Res Bull. 2002;57(6):751-8.
80. Laywell E, Rakic P, Holland D. Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain . Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97:(25): 13883-13888.
81. Kurki P, Ogata K, Tan E. Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. J Immunol Methods. 1988;109:49-59.
82. Allendoerfer K, Durairaj A, Matthews G, Patterson P. Morphological domains of Lewis-X/FORSE-1 immunolabeling in the embryonic neural tube are due to developmental regulation of cell surface carbohydrate expression. Dev. Biol. 1999; 211: 208-219.