

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS PARA EL NUEVO MILENIO II. CELULÓMICA: CLONES, CÉLULAS TRONCALES Y TEJIDOS BIOARTIFICIALES.

PEDRO GARCÍA BARRENO *

* Departamento de Cirugía y Unidad de Medicina y Cirugía Experimental. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. 28007 Madrid.

INTRODUCCIÓN

John Gurdon realizó, en 1970, un experimento, hoy clásico, en el que demostró que un tipo celular adulto especializado contiene la información genética necesaria requerida para generar un organismo completo. Gurdon perforó la membrana de una célula cutánea de una rana adulta con una fina pipeta de vidrio, y extrajo, por succión, su núcleo (núcleo donante). Seguidamente destruyó el núcleo de un oocito fecundado, con lo que privó a la futura célula receptora de la información genética que, en condiciones normales, conduce al desarrollo de un individuo normal. Luego introdujo el núcleo donante en el oocito receptor anucleado. Una vez incubado, ese huevo híbrido se desarrolló en un renacuajo y, tras el proceso de metamorfosis, en una rana adulta normal. El experimento de Gurdon fue el primer ejemplo de la clonación de un animal: la producción de una copia idéntica de un individuo. Mientras que este trabajo apenas trascendió la comunidad científica, el anuncio en 1997 del clonaje de la oveja *Dolly* por Ian Wilmut supuso un hito en los medios de comunicación.

La fabulosa capacidad de diversificación de las células embrionarias y las de ciertos tejidos adultos para regenerarse durante toda la vida del individuo, es el resultado directo de células troncales, un regalo de la naturaleza a los organismos multicelulares. Las células troncales tienen capacidad de autorregenerarse; esto es, dividirse y originar más células troncales, y diferenciarse hacia linajes celulares determinados. Las células troncales embrionarias ini-

ciales (blastocitos) son totipotentes, pueden elegir entre cualquiera de los linajes que especifican el organismo adulto. Por el contrario, las células troncales que residen en el organismo adulto tienen restringidas sus opciones; han seleccionado un programa (linaje) determinado con el que están comprometidas. Sin embargo, existe un pul de células con extraordinaria plasticidad en el adulto.

Consecuencia de las investigaciones pioneras de Martín Evans en el ratón y del reciente éxito paralelo de James A Thompson con tejidos humanos en los que células de la masa interna de blastocitos humanos pudieron cultivarse indefinidamente como células embrionarias troncales pluripotentes, ha sido una nueva ruptura de un dogma biológico; algo parecido a lo que sucedió con el descubrimiento de la transcriptasa inversa por Howard M. Temin, que dio al traste con el dogma establecido del flujo de información genética. Células troncales pluripotentes aisladas de tejidos adultos pueden ser reprogramadas, mediante factores de crecimiento y de diferenciación apropiados, hacia fenotipos celulares deseados para restaurar un déficit funcional determinado (terapia celular); una reprogramación similar a la que ocurre en la clonación de un núcleo somático adulto.

El éxito de la aplicación de las técnicas de transferencia nuclear en un amplio abanico de especies animales ofrece la posibilidad, al alcance de la mano, del clonaje terapéutico humano. Su objetivo es producir células troncales pluripotentes que porten el genoma nuclear del paciente e inducirlas a diferenciarse en

células que reemplacen a otras enfermas: miocardiocitos que sustituyan tejido miocárdico lesionado tras un infarto del miocardio, o células beta productoras de insulina en pacientes diabéticos. Aunque el clonaje terapéutico puede eliminar el problema crítico de la incompatibilidad inmunológica, abre la puerta a un nuevo reto: la ingeniería de órganos y de tejidos.

Cada día, miles de pacientes de todas las edades ingresan en los hospitales por el fracaso de algún órgano vital. La donación de tales órganos parece haber tocado techo. Una nueva estrategia supone una esperanza y una revolución en el tratamiento de esos pacientes: la confección de órganos y tejidos o neoórganos. En unos casos, un ingeniero de tejidos administrará una determinada molécula —un factor de crecimiento, por ej— en una herida o en un órgano que requiere regeneración. Tales moléculas provocarán la migración de células del paciente hacia el lugar lesionado donde se diferenciarán en el tipo celular apropiado para regenerar el tejido lesionado. En otros casos, más ambiciosos, el paciente recibirá células troncales procedentes de un clonaje terapéutico montadas en un andamiaje tridimensional de biopolímeros biodegradables. Tal estructura será trasplantada en el lugar de un órgano o tejido lesionado y extirpado, donde las células, dirigidas por factores apropiados irán tejiendo una estructura sobre un andamiaje de tejido conectivo propio que irá reemplazando, progresivamente, al soporte biodegradable que será destruido. El resultado será un producto final completamente natural, un neoórgano.

CLONACIÓN REPRODUCTIVA

El anuncio del clonaje de la oveja Dolly en el Instituto Roslin, en Escocia, despertó un inusitado interés e inició una polémica inacabada sobre las posibilidades futuras de la técnica. La revista *Nature*, donde Ian Wilmut y cols publicaron el artículo, ilustró su portada con el inesperado clon; la prestigiosa revista *Science* eligió el hecho como el acontecimiento científico del año 1997, y todos y cada uno de los periódicos y semanarios insistieron, una y otra vez, en el asunto. Sin embargo, el mismo experimento —en términos generales— fue realizado con éxito hace décadas por John Gurdon (Figura 1), en la Universidad de Oxford, utilizando ranas; entonces, la noticia apenas tuvo difusión.

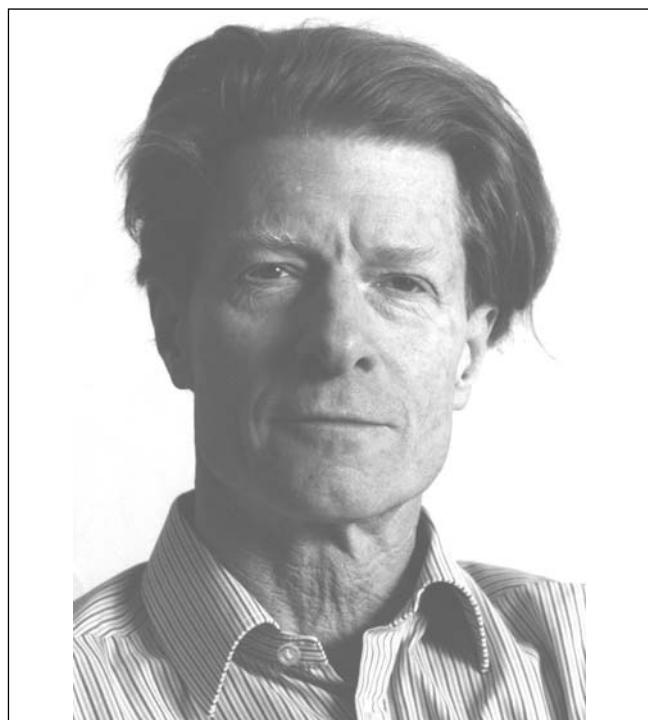


Figura 1. John Gurdon (n 1933). Los experimentos seminales de clonaje realizados por Gurdon fueron estimulados por el director de su tesis doctoral, el Dr. Michael Fischberg, en Oxford (Tomada de: Bier. Pg 10).

Ian Wilmut y cols escribían en el resumen de su artículo

“La fertilización de oocitos de mamíferos se sigue de una serie de divisiones celulares sucesivas y de una progresiva diferenciación, primero en el tejido embrionario precoz y, sucesivamente, en todos y cada uno de los tipos celulares que conllevan al animal adulto. La transferencia de un único núcleo en un estadio específico de desarrollo a un oocito enuclulado no fertilizado, proporciona la oportunidad para investigar si la diferenciación celular en un determinado estadio se acompaña de una modificación genética irreversible. El primer descendiente desarrollado de una célula diferenciada nació tras la transferencia nuclear de una línea celular embrionaria quiescente. Utilizando el mismo procedimiento, anunciamos el nacimiento de cinco corderos vivos a partir de tres nuevas poblaciones celulares establecidas a partir de glándula mamaria adulta, fetos y embrión. El hecho de que un cordero (“Dolly”) derivó de una célula adulta confirma que la diferenciación celular no implica la modificación irreversible del material genético requerido para la morfogénesis a término. El nacimiento de corderos a partir de células fetales diferenciadas y adultas

también refuerza la especulación previa de la posibilidad de obtener desarrollos normales a partir de una amplia variedad de células diferenciadas”

Ya en la introducción, continuaban:

“Se conoce desde hace tiempo que, en anfibios, la transferencia de núcleos de queratinocitos adultos posibilita el desarrollo a formas juveniles, a estadios de renacuajo (Gurdon et al., *J Embriol Exp Morph* 34: 93-112, 1975). Aunque ello implica diferenciación en tejidos y órganos complejos, no se ha señalado el desarrollo hasta el estadio adulto, dejando abierta la cuestión de si un núcleo adulto diferenciado puede reprogramarse completamente”.

Tras una serie de experimentos, iniciados en 1962, en los que utilizó núcleos procedentes de células del epitelio digestivo de renacuajos, John Gurdon realizó, en 1970 un experimento en el que demostró que un determinado tipo celular adulto especializado contiene toda la información genética requerida para generar un organismo completo. Gurdon introdujo la punta de una fina aguja de cristal en una célula cutánea de una rana adulta y, mediante aspiración, obtuvo el núcleo de la célula; sería el núcleo donante del experimento. Gurdon también recogió y esta vez destruyó, el núcleo de un óvulo fertilizado; este huevo enucleado —el huevo receptor— carecía de cualquier información genética que, normalmente, guiaría el desarrollo embrionario, aunque contenía el resto de los demás ingredientes del huevo. Seguidamente inyectó el núcleo de la célula cutánea en el huevo enucleado. Tras una serie de manipulaciones, Gurdon consiguió un proceso morfogénico completo; primero el desarrollo de un renacuajo normal y, tras el proceso de metamorfosis, el de una rana adulta fértil. El experimento de Gurdon representó el primer ejemplo de clonaje de un animal, la creación de una copia idéntica de un individuo, y supuso un vuelco a la teoría entonces imperante de que el núcleo celular perdía su potencialidad muy precozmente durante el desarrollo embrionario. El núcleo de una célula somática adulta diferenciada contiene la dotación informativa genética necesaria para formar un individuo adulto normal; esto es, dispone del programa morfogénico completo (**Figura 2**).

Aunque Dolly representa un avance técnico significativo en la manipulación de embriones de mamíferos,

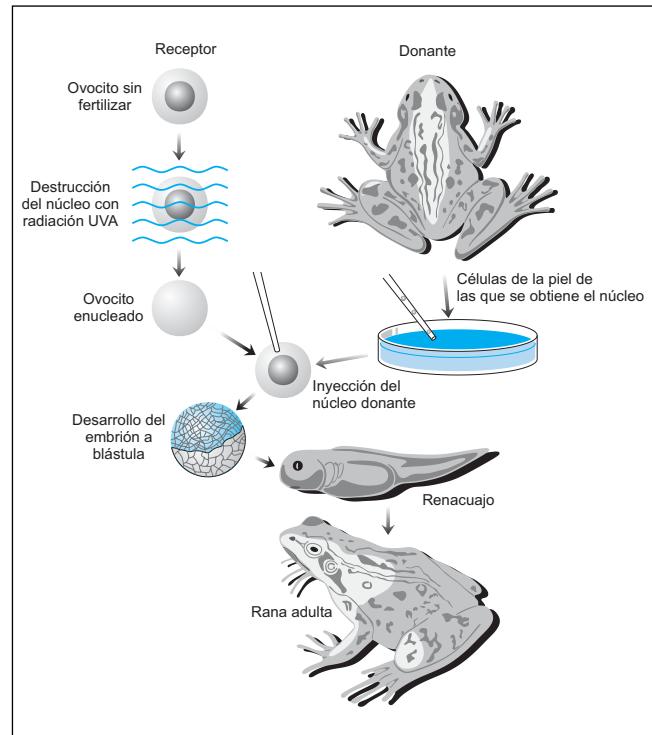


Figura 2. Experimento de J Gurdon. Cada célula de un organismo adulto contiene toda la información genética necesaria para hacer un individuo completo (Modificada de: Bier. Pg 9).

no significa algo conceptualmente diferente de los experimentos originales de Gurdon. En vez de utilizar el núcleo de una célula epitelial de la piel de una rana, Wilmut trasplantó el núcleo de una célula epitelial de una glándula mamaria a un huevo enucleado de una oveja para crear el clón de Dolly (**Figura 3**). Técnicas similares permitirán clonar individuos de cualquier especie, incluida la humana. Por su parte, en 1920, varios años antes del trabajo de Gurdon, Hilde Proescholdt Mangold (**Figura 4**) se incorporaba al laboratorio de Hans Spemann (**Figura 5**), en el Instituto de Zoología de la Universidad de Friburgo. HP Mangold disecó pequeñas regiones de un embrión precoz de rana (embrión donante) y los injertó en varias posiciones en un segundo embrión (embrión receptor). El objeto de tales experimentos de trasplante embrionario era identificar regiones del embrión que pudieran influir el desarrollo potencial de regiones vecinas. En condiciones normales la región dorsal de los embriones vertebrados da lugar al cerebro, médula espinal y columna vertebral; de la región ventral se originan estructuras no neurales como la piel, los músculos y la sangre. Cuando Mangold trasplantó un pequeño trozo del futuro tejido dorsal de un embrión

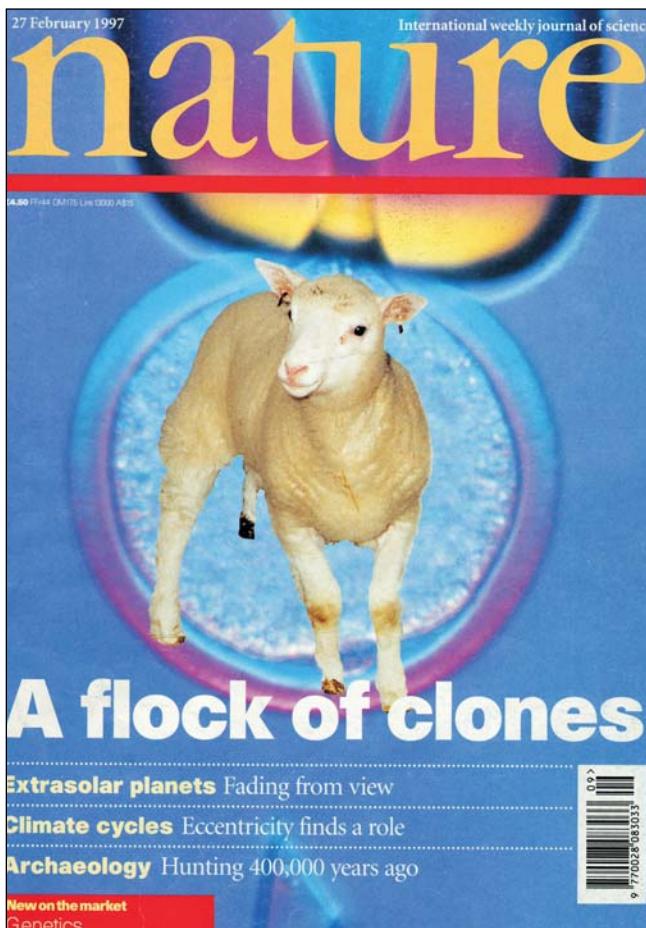


Figura 3. "Dolly".

donante a la región ventral de un embrión receptor, obtuvo un renacuajo con dos cabezas; la propia en la región dorsal y otra ectópica ventral. Se propuso que este acontecimiento inductor estaba orquestado por un conjunto de células organizadoras dorsales ("organizador de Spemann", **Figura 6**). Estos experimentos le valieron a Spemann la concesión del Premio Nobel de Fisiología o Medicina en el año 1935 (Mangold había muerto años antes a causa de un accidente casero).

La confluencia de técnicas derivadas de las descritas —clonaje y reprogramación celular— conducirá al desarrollo de terapias celulares —clonaje terapéutico, ingeniería tisular— que vencerán las dificultades existentes en los procesos de inmunocompatibilidad y rechazo de injertos, y que evitarán la utilización de fármacos inmunosupresores y los complicados protocolos de inmunomodulación. Sin embargo, tales técnicas han reabierto un debate ya añejo. En 1966, Marshall W Nirenberg (**Figura 7**)

realizó unas reflexiones con motivo de su conferencia de aceptación del premio "Research Corporation'66", luego reproducidas como Editorial en la revista *Science* (11 agosto 1967):

Nueva información en el campo de la genética bioquímica está aflorando con inusitada rapidez.. Hasta ahora, este conocimiento ha tenido poca repercusión sobre el hombre. Habrá que recabar más información antes de que sea posible su aplicación práctica. Los problemas técnicos que habrán de superarse son formidables. Sin embargo, cuando tales obstáculos hayan sido superados ese conocimiento tendrá una gran influencia sobre el futuro de la humanidad. El hombre podrá incidir sobre su propio destino biológico. Tal poder puede ser utilizado sabia o perversamente en beneficio o en contra de la humanidad.



Figura 4. Hilde Proescholdt Mangold (1898-1924) llegó al laboratorio de Hans Spemann, en el Instituto de Zoología en Friburgo, en la primavera de 1920 y procedente de la Universidad de Frankfurt. Spemann aconsejó a Hilde trasplantar diversas zonas de una gástrula no pigmentada de tritón en diferentes posiciones de otra gástrula pigmentada de tritón. En mayo de 1921, Proescholdt obtuvo un embrión que tenía un tubo neural secundario (Modificada de: Bier. Pg 32).



Figura 5. Hans Spemann (1869-1941) obtuvo el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 1935 "por su descubrimiento del efecto organizador en el desarrollo embrionario".

Salvador Luria ha dicho: "el progreso de la ciencia es tan rápido que crea un conflicto entre el poder que pone en manos del hombre y las condiciones sociales en que ese poder es ejercido. Ni las precauciones de los científicos, ni una adecuada información pública, ni la sabiduría ciudadana puede compensar las insuficiencias del entramado institucional para hacer frente a las nuevas situaciones".

Aunque el público tiene alguna idea de los recientes desarrollos en genética bioquímica, apenas tiene una vaga noción de lo que puede acaecer en el futuro; ello a pesar de los esfuerzos de los científicos para informar a la sociedad de los probables futuros desarrollos.

¿Dónde estamos hoy? Se conoce el lenguaje genético, y parece establecido que la mayoría si

no todas las formas de vida en este planeta utilizan, con mínimas variaciones, el mismo lenguaje. Mensajes genéticos simples pueden sintetizarse mediante procesamiento químico. La cirugía genética, realizada en microorganismos, es una realidad. Los genes pueden ser identificados, escindidos y aislados de una cepa bacteriana e insertarse en otra, con lo que cambiará genéticamente. Tales cambios son hereditarios. Hasta la fecha no ha sido posible programar células de mamíferos de esta manera.

¿Qué puede esperarse en el futuro? Mensajes genéticos cortos pero con alto contenido informativo serán sintetizados mediante procesos químicos. Dado que las instrucciones estarán escritas en el lenguaje que las células pueden comprender, los mensajes se utilizarán para programar células. Las células llevarán a cabo las instrucciones y los programas se heredarán. Desconozco cuánto tiempo habrá de pasar antes de que puedan programarse células con mensajes químicamente sintetizados. Ciertamente los obstáculos experimentales son formidables. Sin embargo, no tengo la menor duda que tales obstáculos serán vencidos. La única duda es cuándo. Creo que las células serán programadas con mensajes sintetizados en los próximos 25 años. Si los esfuerzos se intensifican, las bacterias podrán ser programadas en no más allá de cinco años.

El punto que requiere un énfasis especial es que el hombre será capaz de programar sus propias células con información sintetizada antes de que sea capaz de valorar adecuadamente las consecuencias a largo plazo de tales manipulaciones, antes de que sea capaz de formular objetivos, y antes de que sea capaz de resolver los problemas éticos y morales que han de surgir. Cuando el hombre llegue a ser capaz de instruir a sus propias células, deberá abstenerse de hacerlo hasta que disponga de la sabiduría suficiente para utilizar este conocimiento en beneficio de la humanidad. Pongo sobre el tapete este problema ante la necesidad de resolverlo, porque las decisiones que conciernen a la aplicación de este conocimiento deben ser

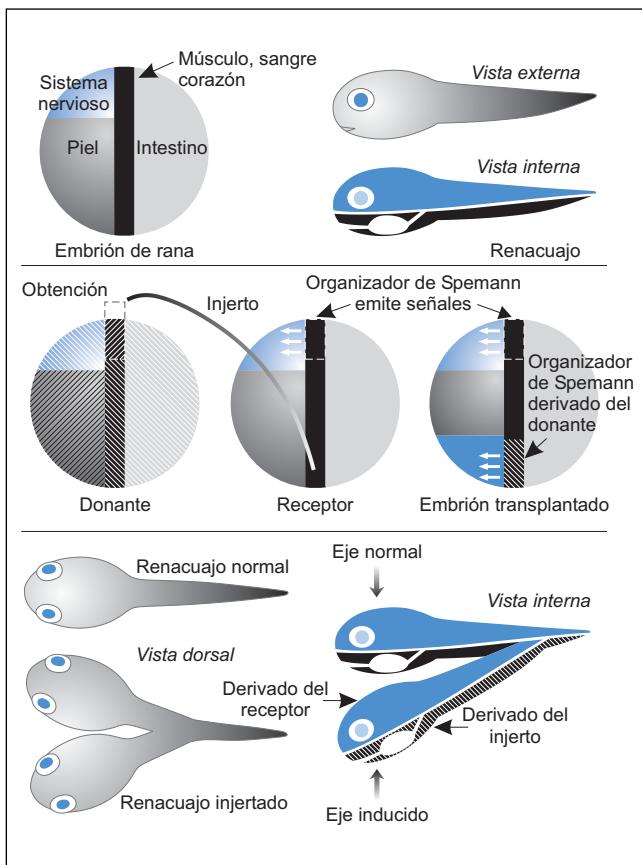


Figura 6. La presencia de centros organizadores: el experimento de Hilde Proescholdt Mangold – Hans Spemann (Modificada de: Bier. Pg 31).

tomadas, en último caso, por la sociedad, y solo una sociedad informada puede tomar decisiones sabiamente.- Marshall W. Nirenberg, National Heart Institute (Will Society Be Prepared?. *Science* 157: 1967)

TERAPIA CELULAR

Consecuencia del trabajo pionero de Martin Evans con células de ratón en la década de 1970s, el número de la revista *Science* correspondiente al día seis de noviembre de 1998 incluyó el artículo “Líneas celulares troncales embrionarias derivadas de blastocistos humanos”, firmado por James A Thomson y cols. Los autores reseñan en el resumen de su trabajo:

“Se describen líneas celulares pluripotentes, derivadas de blastocistos humanos, que tienen cariotipos normales, expresan altos niveles de

actividad telomerasica y expresan marcadores de superficie celular específicos de células troncales embrionarias pero no característicos de otros linajes tempranos. Tras la proliferación indiferenciada *in vitro* durante 4 a 5 meses, tales células mantienen el potencial de desarrollo para formar trofoblasto y derivados de las tres capas germinales embrionarias, incluyendo epitelio digestivo (endodermo); cartílago, hueso, músculo liso y músculo estriado (mesodermo), y epitelio neural, ganglios embrionarios y epitelio escamoso estratificado (ectodermo). Tales líneas celulares podrían ser útiles en biología del desarrollo, en el descubrimiento de fármacos y en traspante médico.”

Una semana después, John D Gearhart y cols publicaron en la Revista de la Academia de Ciencias de los EE.UU. la obtención de células troncales pluripotentes a partir de células primordiales germinales de fetos humanos:

“Células troncales pluripotentes humanas serán de incalculable valor para estudios *in vitro* de aspectos de la embriogénesis humana. Con el objetivo de establecer líneas celulares troncales pluripotentes, se cultivaron cordones gonadales —procedentes de fetos de 5-9 semanas— que contienen células germinales primordiales (PGCs)... Tras un periodo de 7-21 días, las PGCs dieron lugar a colonias (cuerpos embrioides) multicelulares semejantes a las células troncales pluripotentes murinas... El estudio de los cuerpos embrioides mostró una gran variedad de tipos celulares, incluyendo derivados de las tres capas embrionarias. Sobre la base de su origen y propiedades demostradas, los cultivos derivados de PGCs humanas cumplen los criterios de células troncales pluripotentes”.

A la vista de las repercusiones de tales logros, la revista *Time* predijo, en el año 2000, que la ingeniería tisular sería el tema más candente del siglo entrante. No existen dudas sobre la necesidad acuciante de productos destinados a la medicina regenerativa, un término que acoge una variedad de estrategias para reparar o para reemplazar tejidos dañados o enfermos. La edad media de la población occidentalizada incre-

menta progresivamente y, con ello, la incidencia de situaciones degenerativas como osteoporosis, diabetes, enfermedad cardiovascular o las enfermedades de Parkinson y de Alzheimer. La medicina regenerativa promete soluciones más permanentes que las de la actual farmacología.

El cuerpo humano conserva, a lo largo de su vida, una cierta capacidad regenerativa. Por ejemplo, la sangre, la piel o el epitelio digestivo están en continua renovación; por su parte, hígado, huesos, músculos y vasos sanguíneos, comparten una capacidad limitada de autorreparación. Sin embargo, tras un traumatismo o una enfermedad graves, en donde existe un daño tisular extenso, la capacidad de regeneración de los tejidos adultos no es suficiente para enfrentarse con el daño producido. En muchos casos, se produce un tejido cicatrizal que es funcionalmente ineficaz (por ejemplo, en la cirrosis hepática o tras un infarto del

miocardio). Cuando órganos o tejidos están irreparablemente dañados, tienen que ser reemplazados por un órgano artificial o por un órgano donado, para garantizar la supervivencia del organismo afectado. Sin embargo, a pesar de los avances en este campo, los órganos artificiales raramente pueden ser utilizados durante largo tiempo ni aseguran la totalidad de las funciones del órgano perdido. Por su parte, el trasplante de órganos plantea problemas biológicos y, ante todo, la disponibilidad de donantes es el principal factor limitante. Ante esto último, una solución muy controvertida es el xenotrasplante (transferencia de células, de tejidos o de órganos completos, desde una especie a otra), fundamentalmente ante la posibilidad de infecciones cruzadas entre especies.

Por todo ello, la medicina regenerativa —un término no aceptado unánimemente— es una buena alternativa para la reparación o el reemplazamiento de células, de tejidos y de órganos. William Haseltine, presidente y director ejecutivo (CEO) de *Human Genome Sciences* (Rockville, MD) señala que la medicina regenerativa se desarrollará en cuatro fases. La primera es reproducir los mecanismos de reparación que pone en marcha el organismo mediante la utilización *in vivo* de factores de crecimiento. La segunda contempla la implantación de tejidos o de órganos compuestos fuera del organismo tras la identificación de los factores involucrados en su morfogénesis. Un hecho importante es que de los 35000-40000 genes que forman el genoma humano solo 200 de ellos son genes maestros o controladores del crecimiento y de la diferenciación celulares y ellos jugarán un papel estelar en el desarrollo de la medicina regenerativa. La tercera utilizará tecnologías que rejuvenezcan tejidos deteriorados por la edad mediante la reprogramación de los relojes biológicos celulares; por ejemplo, rejuvenecer la piel envejecida del anciano. La fase final explotará la ciencia ahora emergente de la nanotecnología y la ciencia de materiales, que facilitarán matrices de soporte al componente celular; ello con el objetivo de construir órganos, sólidos o huecos, mediante la imbricación de células y de andamiajes.

De momento, los elementos mejor conocidos son los factores de crecimiento que ya se manejan en protocolos encaminados a la regeneración de hueso, piel, cartílago, neuronas, miocitos, miocardiocitos y vasos sanguíneos y, también, en los protocolos de diferen-



Figura 7. Marshall W Nirenberg (n 1927) compartió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 1968 con Robert W Holly (1922-1993) y Gobind H Khorana (n 1922), "por su interpretación del código genético y su función en la síntesis de proteínas".



Figura 8. Stanley Cohen (n 1922) y Rita Levi-Montalcini (n 1909) fueron galardonados con el Premio Nobel de Fisiología o Medicina 1986 "por sus descubrimientos de factores de crecimiento".

ciación de células madres o troncales en tipos celulares específicos (1^a Fase de Haseltine). Ya en la década de 1960s Stanley Cohen y Rita Levi-Montalcini (**Figura 8**) habían identificado los factores de crecimiento fibroblástico y nervioso, y por lo que recibieron el Premio Nobel de Fisiología o Medicina de 1986; y en 1965 se observó el efecto promotor de crecimiento óseo de hueso pulverizado, lo que condujo a la identificación y aislamiento de proteínas morfogénicas del hueso. También, la segunda fase de Haseltine ha iniciado sus primeros pasos que se han encaminado hacia la fabricación de un compuesto dermo-epidérmico indicado en el tratamiento de quemaduras y de úlceras tórpidas. Tal piel artificial, que incorpora células primarias cutáneas susceptibles de transfección génica, abre las puertas a una terapia génica cutánea con objetivos locales (expresión de péptidos bactericidas y/o de factores de crecimiento angiogénico, epidérmico o fibroblástico) a efectos de proporcionar un "bioapósito", o generales (expresión de insulina o factor antihemofílico, por ej.) a efectos de injertar un biorreactor productor de una proteína específica.

Uno de los principales retos de la terapia celular en sus diferentes versiones es el aprovisionamiento celular; células que deben ser uniformes en tipo y calidad, fácilmente disponibles y rigurosamente libres de patógenos. Las células utilizadas pueden ser células primarias como las cutáneas que mantienen su potencial de multiplicación durante toda la vida, o células troncales o madres que retienen la capacidad de diferenciarse en diferentes tipos celulares. El establecimiento de líneas de células troncales pluripotentes (CTPs) inmortales ofrece una poderosa herramienta para la investigación *in vitro* de los procesos de desarrollo celular y organísmico. Tales células también ofrecen un impresionante potencial de aplicaciones clínicas al servir como fuente inagotable de células para trasplante y terapéutica regenerativa.

Las células troncales o madres tienen la capacidad, en cultivo, de dividirse durante períodos indefinidos y de dar lugar a células especializadas (**Figura 9**). Tales células se comprenden mejor en el contexto del desarrollo humano normal. Un individuo comienza su

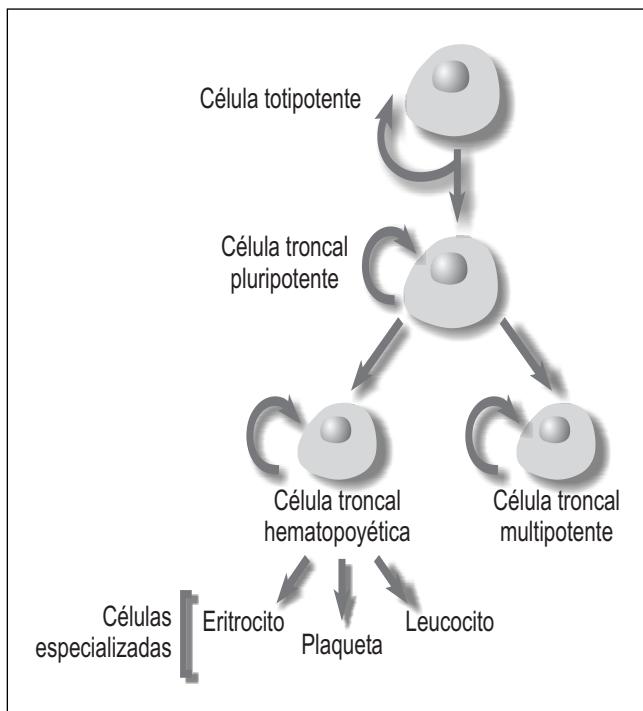


Figura 9. Diferentes células troncales.

desarrollo a partir de la fertilización de un oocito o huevo por un espermatozoide; un encuentro por el que se forma una célula con el potencial necesario para formar un organismo completo. Este huevo fertilizado es totipotente; ello quiere decir que su potencial es total. En las primeras horas tras la fertilización, esta célula se divide en células idénticas e igualmente totipotentes; ello significa que cualquiera de esas células, si se implantara en un útero, tiene el potencial para formar un feto. En efecto, gemelos idénticos se desarrollan cuando dos células totipotentes se separan y desarrollan dos individuos; dos seres humanos genéticamente idénticos. Aproximadamente cuatro días tras la fertilización y tras varios ciclos de divisiones celulares que conforman una esfera celular maciza con aspecto de una mora (mórlula), tales células totipotentes comienzan a especializarse, formando una esfera celular hueca denominada blastocisto. El blastocisto tiene una capa externa de células y, dentro de la cavidad y en una zona determinada, una aglomeración de células denominada "masa celular interna". En un

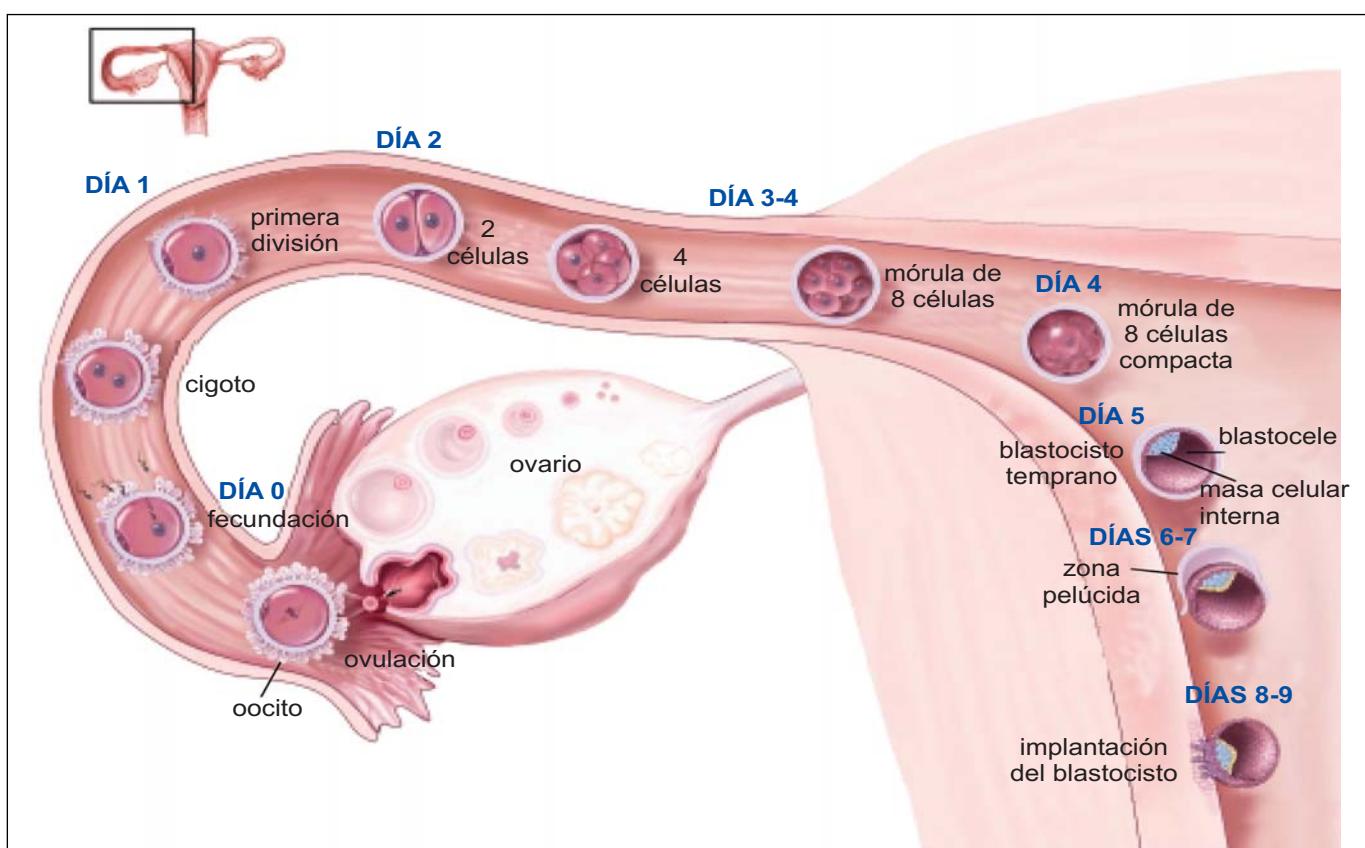


Figura 10. La compleja marcha del embrión: diferentes estadios de la etapa pre-embrialaria (Modificada de: Kirschstein y Skirboll. Pg A-4).

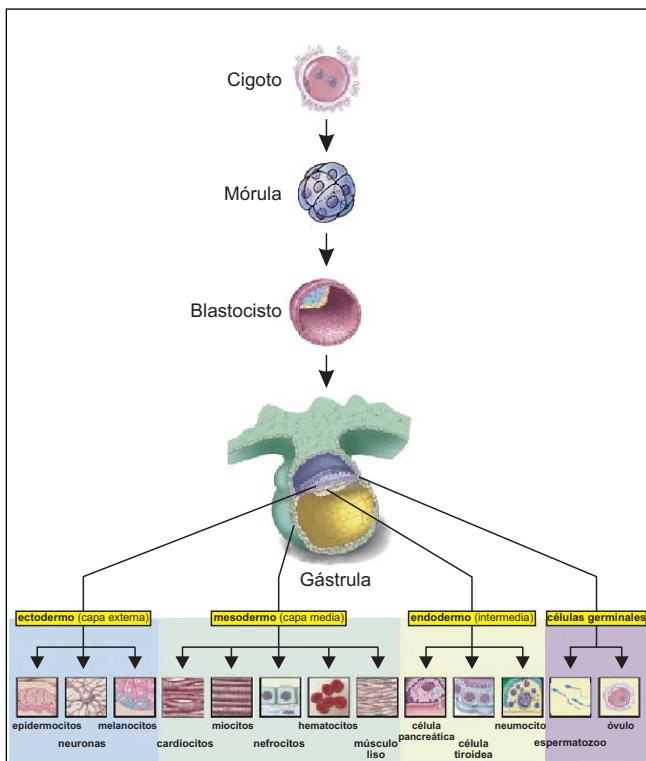


Figura 11. Diferenciación de los tejidos humanos a partir de las tres láminas embrionarias (Modificada de: Kirschstein y Skirboll. Pg 2).

estadio posterior (gástrula), la capa exterior de células dará lugar a la placenta y a otros tejidos de soporte embrionario necesarios e imprescindibles para el desarrollo fetal en el útero (**Figura 10**). De la masa celular interna derivarán la totalidad de los tipos celulares que forman un individuo adulto (**Figura 11**).

Aunque cualquiera de las células (blastómeros) de la masa celular interna del blastocisto puede dar lugar a la totalidad de los tipos celulares que forman un individuo adulto, ellas no tienen la capacidad de construir un individuo porque son incapaces de formar la placenta y los tejidos de soporte necesarios para el desarrollo del feto en el útero. Las células de la masa celular interna son pluripotentes; ello porque son capaces de dar lugar a la mayoría pero no a todos los tipos celulares que son necesarios para el desarrollo fetal. Dado que su potencial no es total, no son totipotentes y no son embriones. En efecto, si cualquiera de las células de la masa interna se colocara en un útero materno no desarrollaría un feto. Las células troncales pluripotentes sufren una especialización progresiva en células madres comprometidas a dar lugar a células con una función definida; por ejemplo, células madres hematopoyéticas que darán lugar a las diferentes estirpes celulares sanguíneas (eritrocitos, leucocitos y plaquetas) o células madres cutáneas que darán lugar a las células de la piel. Tales células madres más especializadas se denominan multipotentes. Mientras que las células pluripotentes son esenciales en los desarrollos embrionario y fetal, las células multipotentes lo son en la infancia y en la edad adulta. Por ejemplo, una de las células madres mejor conocida es la célula madre hematopoyética que reside en la médula ósea —aunque pueden encontrarse en muy escaso número en la sangre circulante— a lo largo de toda la vida de un individuo; tal célula madre es responsable de mantener la homeostasis celular sanguínea; ello reponiendo los hematíes, leucocitos y plaquetas que son continua-

Célula germinal	Célula reproductora: oocitos y espermatoides.
Célula germinal primordial	Célula fetal precursora de las gónadas.
Célula pluripotente	Célula capaz de dar lugar a cualquiera de los tipos celulares derivados de las tres capas embrionarias (linajes ecto-, meso- y endodérmico).
Célula somática	Cualquier célula no reproductora de un organismo. Por ejemplo, cardiomiocto, hepatocito, leucocito, neurona, plaqueta, etc.
Célula totipotente	Célula con capacidad de producir los tejidos extraembrionarios, el embrión y la totalidad de los tejidos y órganos fetales.
Célula troncal	Cualquier célula capaz de dividirse indefinidamente en cultivo y capaz de dar lugar a células especializadas. Sinón.: célula madre.
Teratocarcinoma	Tumor maligno formado a expensas de tejidos embrionarios y, en ocasiones, de los tejidos extraembrionarios. Se localiza, preferentemente, en los testículos.
Transferencia nuclear de células somáticas	La transferencia de un núcleo de una célula somática a un oocito al que se ha extraído del núcleo. Sinón.: clonaje.

Tabla 1

mente destruidos. Una persona no puede vivir sin célula madres hematopoyéticas (**Tabla 1 y Figura 12**).

En la actualidad, células troncales pluripotentes humanas pueden obtenerse de varias fuentes. Thomson *et al* aislaron CTPs directamente de la masa celular interna de pre-embiones humanos en estadio blastocítico. Los investigadores recibieron embriones FIV (fertilización *In Vitro*) excedentes de las necesidades establecidas para tratamientos de infertilidad. Los embriones fueron obtenidos con propósitos de reproducción, no de investigación. Tras la obtención del consentimiento informado y aprobación de las parejas donantes, el equipo investigador disoció las células de la masa celular interna y, tras cultivarlas, obtuvo una línea de células troncales pluripotentes. Por su parte, el equipo de Gearhart *et al* aisló células troncales pluripotentes de tejido fetal obtenido de embarazos interrumpidos. Tras la obtención del consentimiento informado y la aprobación de las parejas progenitoras que habían tomado la decisión de abortar, los investigadores tomaron células (células primordiales germi-

nales) del tejido fetal destinado a formar ovarios o testículos. Aunque las células desarrolladas en los laboratorios de Thomson y de Gearhart derivaron de fuentes diferentes, parecen muy similares en sus comportamientos (**Figura 13**).

Hay otras dos posibilidades para obtener célula troncales pluripotentes. Una, células carcino-embrionarias derivadas de teratocarcinomas. Mientras que las células troncales derivadas de la masa celular interna del blastocisto y las derivadas de la gónada primitiva fetal, son diploides, las líneas celulares carcino-embriónarias son típicamente aneuploides por lo que no son un modelo apropiado de un desarrollo normal. Por otro lado, la utilización de transferencia nuclear celular somática (TNCS) puede ser otra vía por la que pueden obtenerse CTPs. En estudios con animales utilizando TNCS, los investigadores toman un oocito animal normal del que extirpan el núcleo. El material restante del oocito enucleado contiene nutrientes y otros factores que son esenciales para el desarrollo del embrión. Luego, una célula somática (cualquier célula

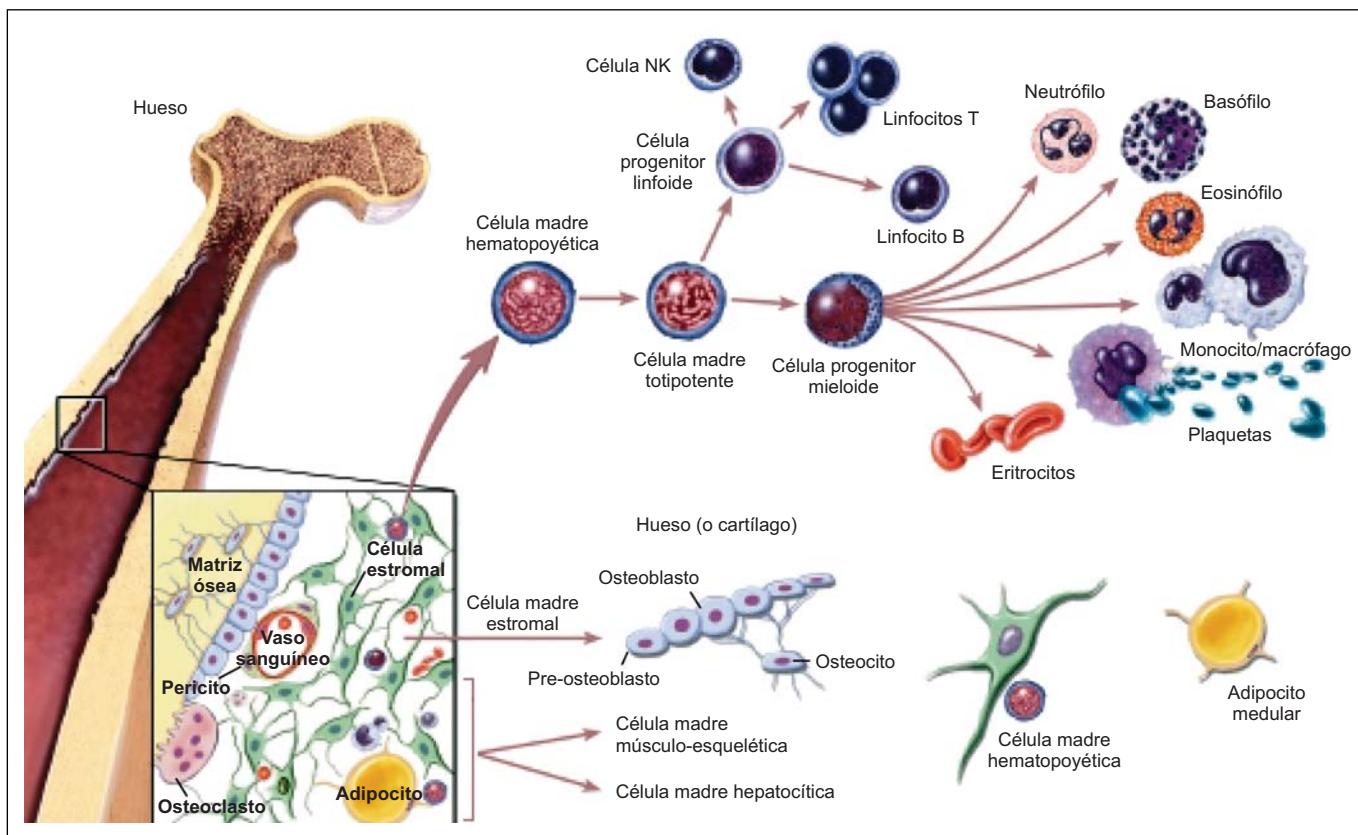


Figura 12. Diferenciación de las células troncales hematopoyéticas y estromales, de la médula ósea (Modificada de: Kirschstein y Skirboll. Pg 33).

que no sea un oocito o un espermatozoo) se pone en contacto con el oocito al que se extirpó el núcleo; contacto tras el que se fusionan ambas células. La célula resultante de la fusión es una célula totipotente cuyos descendientes celulares pronto formarán un blastocisto, cuyas células de la masa celular interna pueden utilizarse como CTPs. Una variante de este procedimiento, ampliamente debatida, es el clonaje terapéutico por el que se obtiene un blastocisto a partir de la transferencia del núcleo de una célula somática de un enfermo a un oocito anucleado donado. En este último caso, las células troncales pluripotentes serán utilizadas en beneficio del propio enfermo; ello, produciendo el tipo celular adecuado para reemplazar el tejido enfermo causante de su enfermedad.

Varias son las razones que justifican el aislamiento e investigación de las células troncales pluripotentes. En el plano más fundamental, las CTPs pueden ayudar a comprender los complejos acontecimientos que ocurren durante el desarrollo o morfogénesis. En este contexto, un objetivo primario es la identificación de

los factores involucrados en el proceso de toma de decisiones que resulta en la especialización celular. Se conoce que la activación y el silencio génicos son esenciales en este proceso, pero se desconocen los mecanismos que los controlan. Algunas de las condiciones médicas más comprometidas tal como el cáncer o las malformaciones congénitas se deben a aberraciones en la especialización o en la división celular. Un mejor conocimiento del proceso morfogénico en condiciones normales permitiría atajar aquellas situaciones patológicas. La investigación con CTPs podría modificar las estrategias de diseño de fármacos más eficaces y más seguros. Las CTPs humanas son modelos fiables para servir de primer filtro en el estudio de nuevos fármacos; sólo aquellas moléculas que superaran este primer filtro pasarían a ser comprobadas en animales de laboratorio y, por último, incluidas en ensayos clínicos. Pero el objetivo más ambicioso es la utilización de las CTPs en “terapia celular”. Numerosas enfermedades son el resultado de aberraciones de la función celular o de destrucción tisular. Hoy, las células y órganos donados son la única

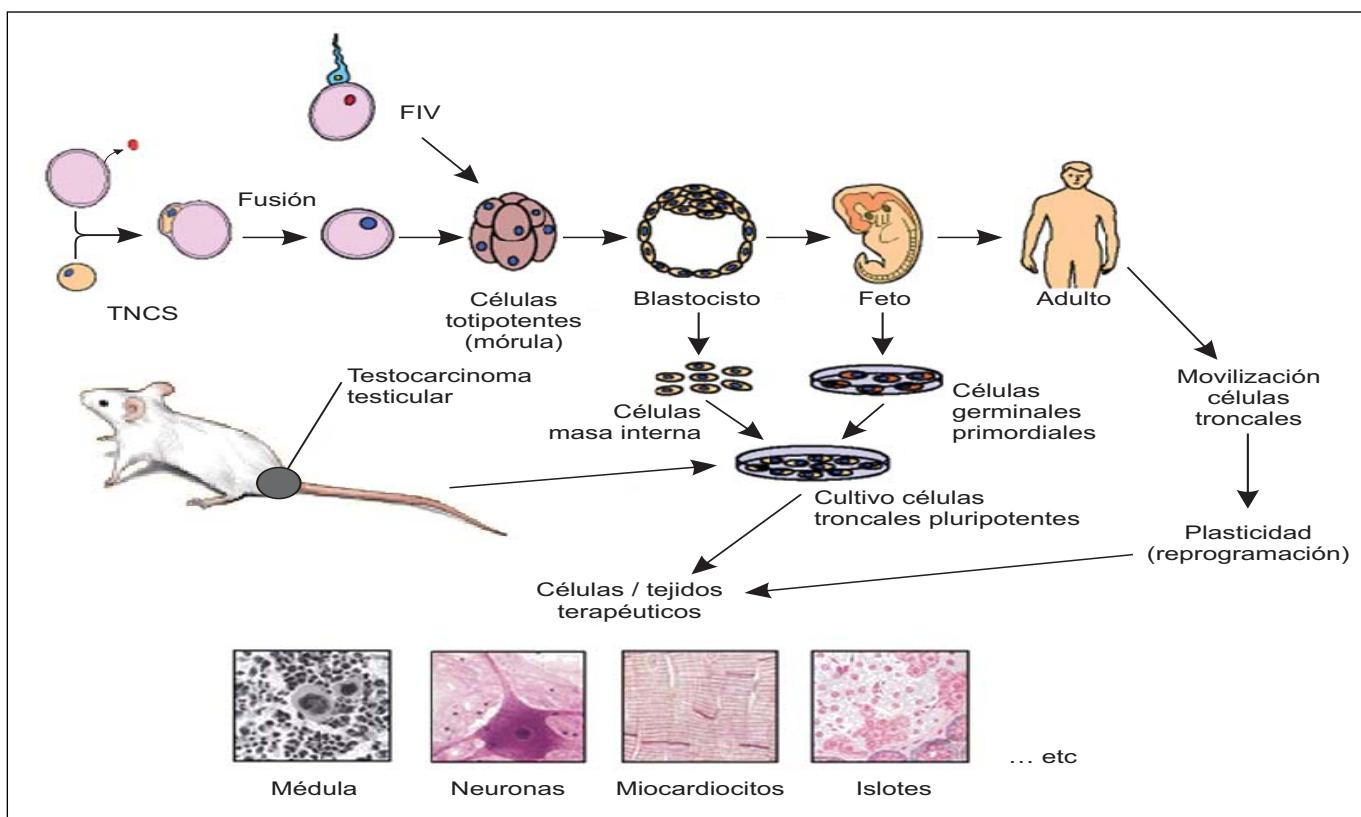


Figura 13. Obtención de células troncales a partir de la masa celular interna del blastocisto, de las células germinales primordiales del feto, de células troncales del adulto o de un teratocarcinoma.

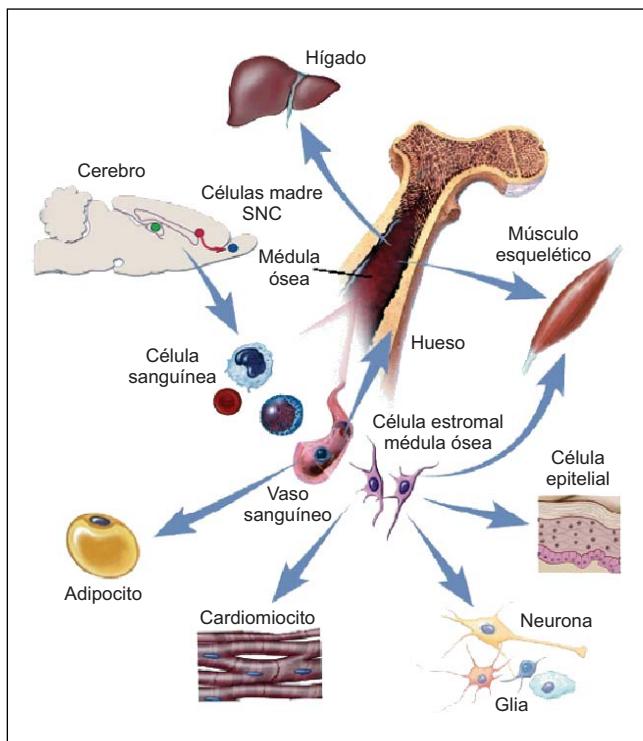


Figura 14. Plasticidad o interconversión funcional, entre células troncales del adulto (no humanas) (Modificada de: Kirschstein y Skirboll. Pg 27).

alternativa para sustituir o reparar los tejidos lesionados. Desafortunadamente, el número de personas que esperan un órgano o tejido supera con creces las disponibilidades. Las CTPs, estimuladas para desarrollar células especializadas, ofrecen la posibilidad de disponer de una fuente inagotable de células y de tejidos para tratar un amplio abanico de patologías como las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, lesiones de la médula espinal, infartos cerebral o miocárdico, diabetes, etc. No hay, prácticamente, campo alguno de la medicina ajeno a esta innovación terapéutica. Por ejemplo, el trasplante de cardiomiositos representa una nueva esperanza a miles de pacientes que padecen insuficiencia cardiaca, o el trasplante de células beta-pancreáticas puede mitigar la necesidad de insulina en pacientes diabéticos.

Sin embargo, la tecnología de las CTPs dista mucho de estar dominada. En primer lugar, no está resuelta la cadena de acontecimientos que dirigen a una CTP hacia la especialización deseada, y lo más importante, el trasplante de CPPs está sometido a las mismas reglas de compatibilidad que el trasplante de órganos y de tejidos. Sólo el clonaje terapéutico —una

modalidad de TNCS— evita los problemas de rechazo; ello porque las CTPs derivan de un blastocisto genéticamente idéntico al núcleo donado por el propio paciente.

Tal como se ha indicado, células troncales multipotentes se encuentran en algunos tipos de tejidos adultos. De hecho, se indicó, tales células troncales son necesarias para reponer las células que, normalmente, se destruyen y/o eliminan del organismo (células sanguíneas, células epiteliales digestivas, células epidérmicas cutáneas). Células troncales multipotentes no se encuentran en todos los tejidos adultos, pero el catálogo se amplía cada día. Por ejemplo, un dogma bien aceptado establecía que el sistema nervioso central era estable y carente de células con potencial regenerador; sin embargo se han identificado y aislado células troncales neurales en ciertas áreas cerebrales.

Por su parte, solo recientemente se han tenido pruebas de que células multipotentes como, por ejemplo, células troncales hematopoyéticas pudieran reprogramarse para producir células cutáneas, hepatocitos u otro tipo celular diferente a una célula troncal hematopoyética o a algún tipo específico de célula sanguínea, como cabía esperar. Diferentes modelos animales han demostrado que algunas células troncales adultas son capaces de reprogramarse y diferenciarse en diversos tipos de células especializadas, diferentes de la línea celular primitiva. Por ejemplo, en el ratón se ha demostrado que célula troncales neurales colocadas en la médula ósea producen diversas células sanguíneas; y en la rata, célula troncales encontradas en la médula ósea son capaces de producir hepatocitos y neuronas (“transformación de sangre en hígado o en cerebro”). En todo ello, el ambiente celular parece ser determinante. Tales hallazgos sugieren que incluso después de que una CTP ha comenzado la especialización, tal célula puede, bajo determinadas condiciones, ser más flexible de lo que un principio se pensó (**Figura 14**).

La investigación con células troncales adultas humanas sugiere que las células multipotentes tienen un gran potencial de utilización en investigación y en el desarrollo de terapias celulares. Por ejemplo, sería de gran utilidad el empleo de células troncales adultas en trasplante. Si pudieran aislarse células troncales

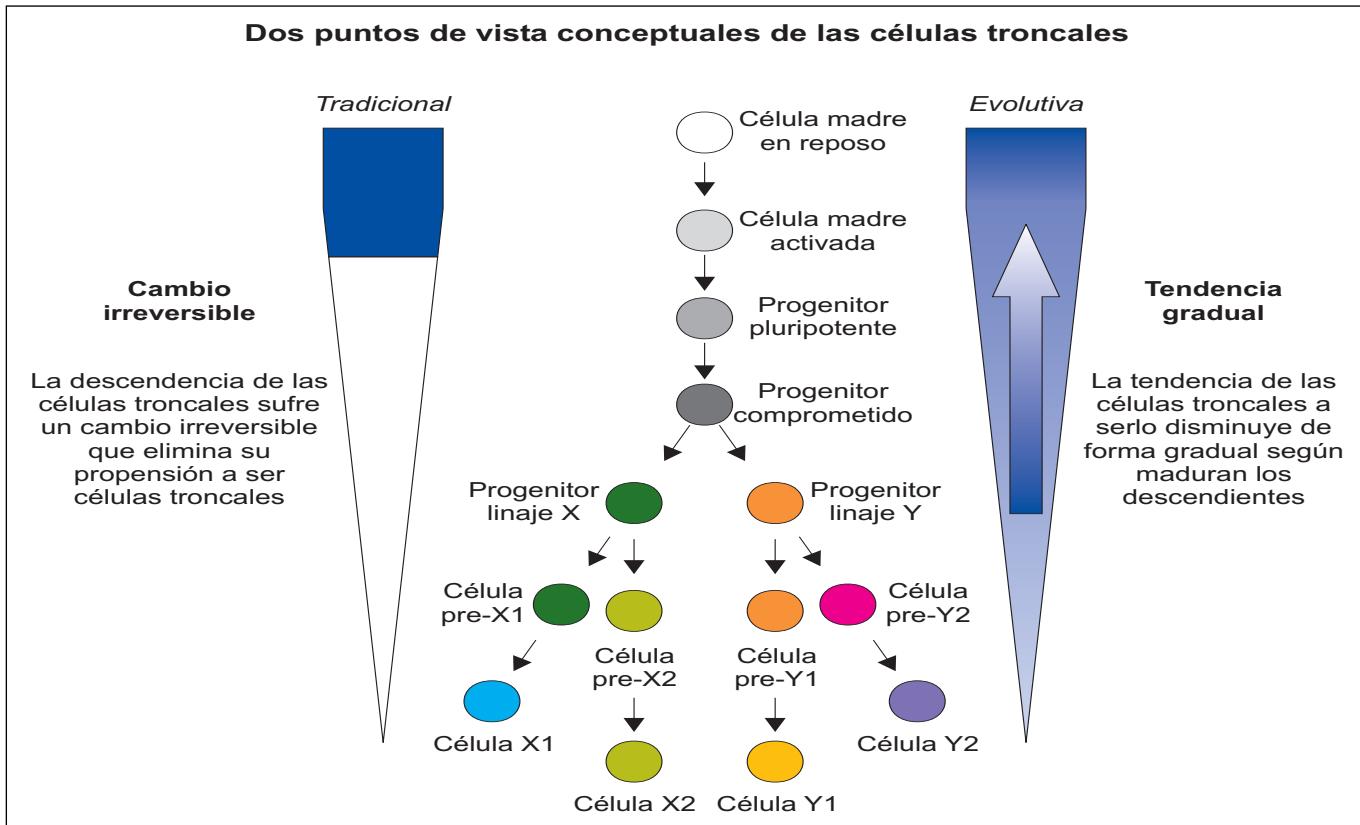


Figura 15. Dos puntos de vista conceptuales de las células troncales (Modificada de: Blau, Brazelton y Weimann. Pg 837).

adultas de un paciente, inducir su división y dirigir su especialización y, luego, retrasplantarlas al paciente, es indudable que tales células pasarían desapercibidas al sistema de vigilancia inmunológico siendo aceptadas. Ello evitaría la necesidad de acudir a blastocistos humanos como fuente de células troncales evitando la polémica ético-legal existente.

Sin embargo existen limitaciones a dicha estrategia. En primer lugar, no todos los tejidos adultos parecen que poseen células troncales disponibles; en segundo lugar, las células troncales adultas son difíciles de aislar y purificar y existen en cantidades mínimas; una cantidad que disminuye con la edad. Por ejemplo, células cerebrales capaces de actuar como células troncales neurales sólo han podido ser obtenidas a partir de procedimientos neuroquirúrgicos en pacientes epilépticos, lo que no es un procedimiento trivial. Cualquier intento para usar células troncales del propio cuerpo de un paciente requiere que tales células puedan ser, primero, obtenidas y, luego, cultivarlas en cantidad suficiente para utilizarlas terapéuticamente. En algunas situaciones agudas puede ser que no haya

tiempo suficiente para completar el “proceso de fabricación”. En otros casos, como los debidos a un defecto genético, puede ser que el mismo defecto que se pretende combatir afecte a las propias células troncales; en tal caso las células troncales del paciente no serán apropiadas para el trasplante; en este caso, la combinación de terapia génica puede obviar el problema. También, las células troncales adultas pueden albergar errores del ADN propios de las células adultas. Además, no está claro que las células troncales de los adultos sean pluripotentes en el sentido que lo son las CTPs del blastocisto. Todo ello son puntos débiles, hoy —seguro que resueltos mañana—, en la utilidad potencial de la terapia con células troncales adultas.

In vitro, la diferenciación de células troncales embrionarias sucede cuando las señales de autorrepliación provenientes de factores de crecimiento no son suficientes en el medio de cultivo. La naturaleza exacta de tales señales se desconoce en el momento actual, aunque parece que son suministradas por los cebadores (fibroblastos) del medio de cultivo. Las propiedades distintivas de las células en estadio pluripo-

tente incluyen la expresión de fosfatasa alcalina y de varios marcadores en la superficie celular. Dos características moleculares adicionales de las células madres son las expresiones de telomerasa y de un factor de transcripción específico (Oct 3 / 4). La telomerasa es la enzima responsable del mantenimiento de los telómeros en los extremos cromosómicos y se expresa, únicamente, en células embrionarias y de la línea germinal; por el contrario, la mayoría de las células somáticas no muestran actividad telomerasa con lo que sus telómeros se acortan con cada división celular —un mecanismo involucrado en la senescencia celular—. La expresión del factor de transcripción señalado se encuentra, exclusivamente, en células embrionarias tempranas y en la línea germinal y es necesario para la formación de la ICM. En cualquier caso, mientras que la ciencia de las células troncales progresó sobre bases cada vez mejor establecidas, la política sobre sus posibilidades es mucho menos clara.

Como ha sido indicado, la obtención de CTPs humanas ha desencadenado enormes expectativas sobre la base de su posible utilización en el estudio de la biología del desarrollo y en aplicaciones humanas que incluye el trasplante celular. El objetivo primario es manipular la diferenciación de células ES humanas de tal manera que puedan obtenerse, *in vitro* o *in vivo*, una población uniforme de precursores o, incluso, células completamente diferenciadas. Hasta el momento, los resultados obtenidos permiten agrupar los factores de diferenciación en tres grupos: los que inhiben los linajes endodérmico y ectodérmico pero permiten la diferenciación de células mesodérmicas (TGF- β 1 y activina-A); un grupo que incluye factores que permiten o inducen la diferenciación en células ectodérmicas y mesodérmicas (ácido retinoico, bFGF, BMP-4 y EGF), y un tercer grupo que permite la diferenciación de los tres linajes embrionarios (NGF y HGF). La comparación de las diferenciaciones espontánea e inducida, mediante factores de crecimiento, sugiere que la mayoría de tales factores inhibe la diferenciación de tipos celulares determinados y que el efecto negativo es más pronunciado que un hipotético efecto inductor. Tal comportamiento apunta a que la diferenciación específica pudiera conseguirse utilizando inhibidores (follistatina, noggin) que bloquean factores de crecimiento endógenos producidos durante la diferenciación.

En resumen, las células troncales han sido consideradas como células indiferenciadas capaces de proliferar, autorregenerarse, productoras de una numerosa progenie de células diferenciadas y regeneradoras de tejidos. Generalmente se pensó que sólo las células troncales embrionarias son pluripotentes, dado que durante las fases más tempranas del desarrollo tal plasticidad es crítica. Numerosos datos han demostrado este supuesto y la diferenciación de células troncales embrionarias en un amplio rango de tipos celulares está bien documentada *in vivo* e *in vitro*. Por el contrario, el punto de vista tradicional respecto a las células troncales en el adulto restringe su potencial regenerativo y de diferenciación a los tejidos en que residen. Son ejemplos válidos los hepatocitos que proliferan tras hepatectomía parcial, las células troncales hematopoyéticas que reconstruyen la población hematocítica tras irradiación letal, las células satélites musculares que reparan el músculo esquelético dañado o los precursores queratinocíticos que participan en la cicatrización de las heridas. Además de la capacidad

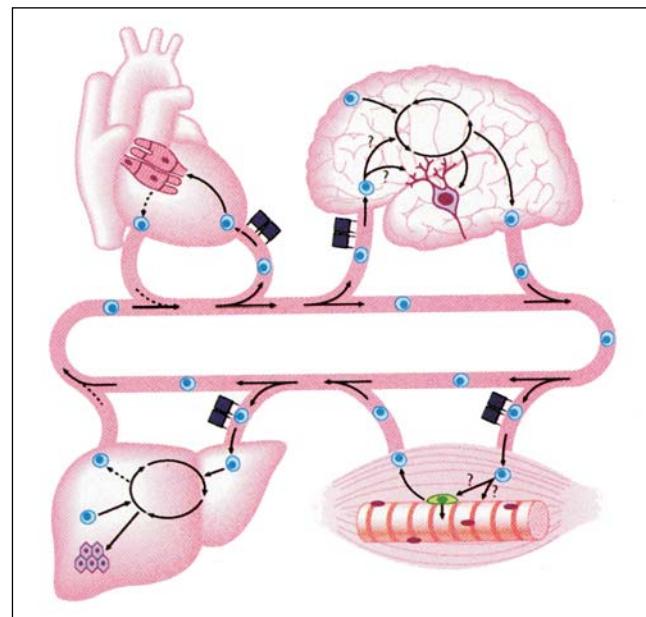


Figura 16. Transiciones en la identidad y diferenciación celulares. Además de las células troncales tejido-específicas, algunas células troncales pueden viajar a través del sistema circulatorio. La flexibilidad es la característica distintiva de este sistema celular, que permite la regeneración tisular a partir de cambios en el destino celular en respuesta a las necesidades. Los "carteles publicitarios", situados a la entrada de los diferentes circuitos locales, representan las señales de localización y de diferenciación que especifican el "nuevo" destino de las células reclutadas (Modificada de: Blau, Brazelton y Weimann. Pg 830).

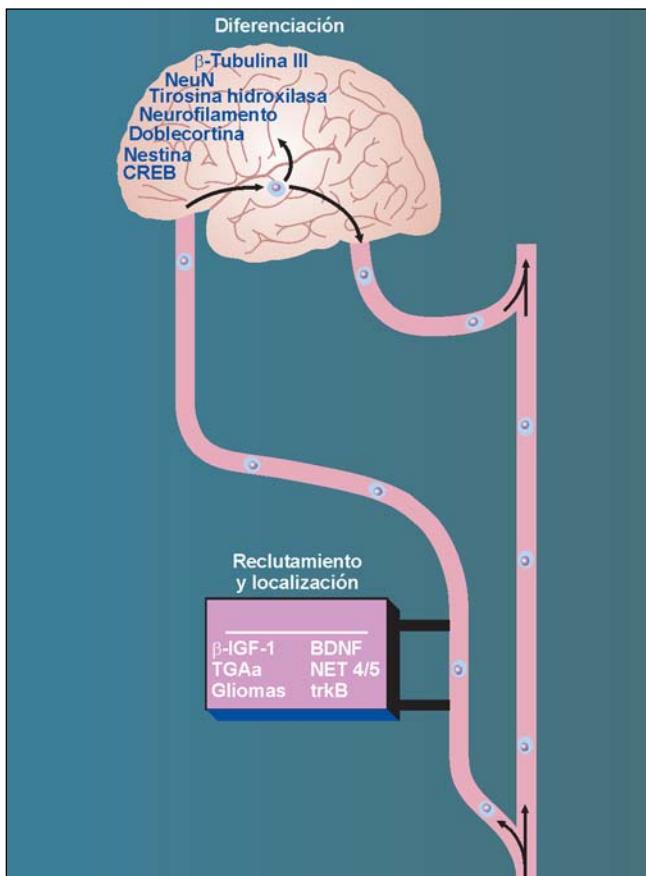


Figura 17. Orquestación de transiciones del destino celular tejido-específico. Los factores involucrados en el desarrollo neuronal incluyen factores de reclutamiento o acogida y de crecimiento que conducen a la expresión de genes característicos neuronales (Modificada de: Blau, Brazelton y Weimann. Pg 835).

de reparación del tejido dañado, las células troncales juegan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis tisular, por ejemplo asegurando las dotaciones celulares sanguínea y cutánea. Invariablemente, los diagramas de la diferenciación de la progenie de las células troncales del adulto han sido lineales e irreversibles, mostrando una progresión ordenada a lo largo de una vía perfectamente definida que concluye en un tipo celular terminal diferenciado (Figura 15).

Sin embargo, este punto de vista del potencial celular troncal del adulto ha sido revisado recientemente. Se ha demostrado que células derivadas de la médula ósea no solo garantizan el reemplazamiento de los hematocitos sino que también contribuyen al mantenimiento de la masa celular del músculo, cerebro, hígado, cerebro y endotelio vascular. Algunos trabajos señalan un movimiento de tales células troncales en

dirección opuesta y sugieren que células derivadas del músculo o del cerebro pueden dar lugar a células sanguíneas. Células estromales de la médula ósea, distintas de las células troncales hematopoyéticas, son capaces de producir una multitud de tipos celulares. Aunque muchas de tales transiciones celulares se han observado, principalmente, tras daño tisular, en algunos casos tales transiciones entre distintos compartimentos titulares se han observado en ausencia de lesión tisular. Se conoce desde hace décadas que células diferenciadas adultas pueden cambiar su destino. Por ejemplo, en el adulto se produce transdiferenciación de células del iris productoras de melanina en células productoras de cristalinas tras la extirpación del cristalino, o cuando células musculares diferenciadas se fusionan con células maduras procedentes de cualquiera de las tres láminas germinales embrionarias (hepatocitos endodérmicos, queratinocitos ectodérmicos o fibroblastos mesodérmicos), la expresión de genes musculares en los núcleos no musculares ocurre en unos pocos días. Estos experimentos, más el clonaje de anfibios y de mamíferos, han demostrado que el estado de diferenciación de las células adultas no es fijo e irreversible, sino que está regulado por un proceso dinámico activo que requiere regulación con-

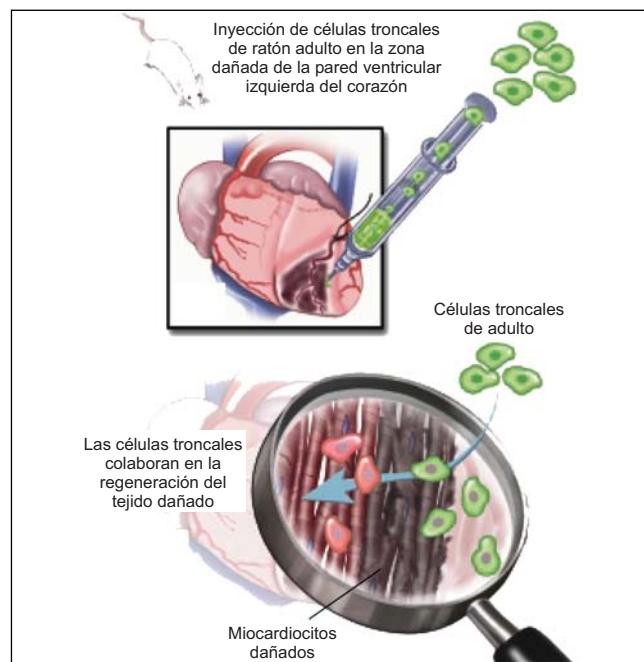


Figura 18. Reparación del músculo cardíaco con células troncales procedentes de animales adultos y administradas *in situ* o por vía endovenosa (Modificada de: Kirschstein y Skirboll. Pg 90).

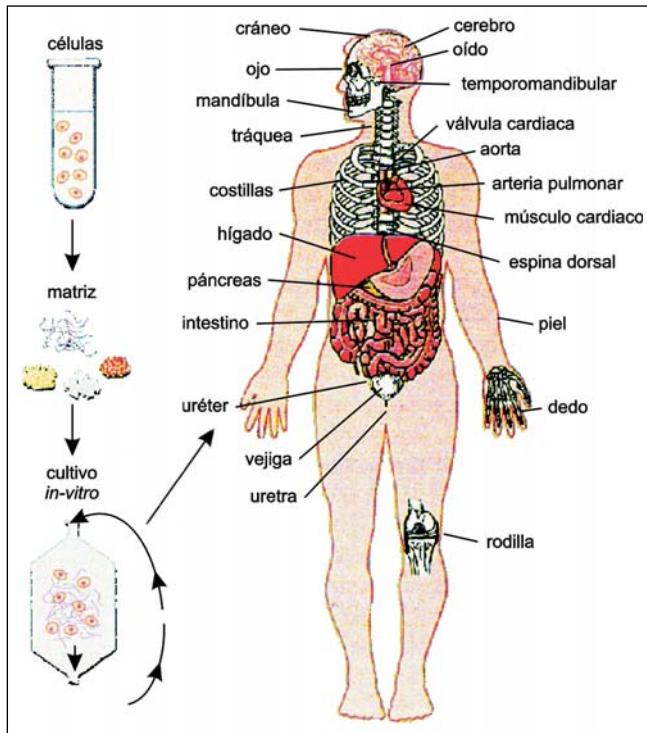


Figura 19. Ingeniería tisular: células + biopolímero = órgano bioartificial (Modificada de: Vacanti y Langer. Pg si 32).

tinua. El descubrimiento de que células troncales del adulto puedan residir originalmente en un tejido y luego contribuir a otro, sugiere un grado previo y desconocido de plasticidad en la función de las células troncales del adulto.

Tales observaciones sugieren que la biología de las células troncales puede ser más compleja de lo hasta hace poco tiempo aceptado. El descubrimiento de que células troncales en el adulto, inicialmente residentes en un determinado tejido pueden contribuir a la integridad de otro en un momento dado, sugiere un grado de plasticidad en la función de las células troncales en el adulto hasta ahora desconocido. Ello indica que cambios en el destino celular son una propiedad natural de las células troncales en el adulto; propiedad que puede estar involucrada en la homeostasis celular fisiológica y en la reparación del daño tisular, a lo largo de la vida de un individuo. Aunque la frecuencia de tales acontecimientos es baja, recientes e insospechados hallazgos sugieren que las células troncales en el adulto están en un estado de flujo y que el concepto de células troncales tejido-específicas está obsoleto. De acuerdo con ello, las células troncales en el adulto no sólo actúan localmente, en los tejidos en que

residen, sino que pueden ser movilizadas y reclutadas en la circulación para ocuparse en la regeneración de diversos tejidos en sitios distantes. Incluso tipos celulares marcadamente especializados pueden reprogramarse, revirtiendo su estado diferenciado, y contribuir al pul de células troncales circulantes, como han demostrado estudios recientes con células musculares y con neuronas (**Figura 16**). De acuerdo con este nuevo punto de vista, al menos algunas células troncales del adulto tienen una gran plasticidad y son capaces de rediferenciarse en microambientes apropiados. Factores de orientación (*homing*) atraen a las células troncales circulantes y, una vez reclutadas en el sitio de interés, factores de crecimiento dirigen su reprogramación o rediferenciación (**Figura 17**). Lo mismo es válido para células pluripotentes exógenas introducidas —vía endovenosa o *in situ*— para tratar una lesión tisular (**Figura 18**). Por otro lado, la capacidad de actuar como célula troncal puede ser una función celular compartida por numerosos tipos celulares; de la misma manera que la práctica totalidad de las células de un organismo pueden activar un programa apoptótico en respuesta a determinados tipos de agresión, diversas células del organismo podrían ser capaces de de actuar como células troncales ante determinadas señales. Por tanto, una célula troncal no es, necesariamente, una entidad celular particular sino una función que puede ser asumida por diversos tipos celulares.

Como conclusión, el propósito de la terapia celular es canalizar, *in vivo*, células humanas multipotentes con alta capacidad proliferativa en programas de diferenciación específicos; un objetivo que se considera factible dentro de los próximos cinco años. Un logro más ambicioso es la construcción de órganos, quizás un riñón o un ojo o, incluso, una parte del cerebro; esto representa un reto mucho mayor que la "mera" generación de tipos celulares especializados. No menos de 25 años habrán de pasar para ello; por ahora sólo ha sido posible ingenierizar un sucedáneo dermo-epidérmico útil en el tratamiento de quemaduras y de úlceras de distinto tipo. Es posible especular que la reprogramación de una célula troncal queratinocítica en cualquier otra célula troncal somática pueda, en un futuro más o menos próximo, tratar una enfermedad específica a partir de una simple biopsia de piel del paciente. Por otro lado, la coincidencia de las terapias génica y celular hará, en último término, inagotable tal

estrategia. Más cerca se antoja la combinación de la ingeniería celular con andamiajes o matrices de biopolímeros a efectos de conseguir órganos bioartificiales (ingeniería de tejidos) (**Figura 19**).

BIBLIOGRAFÍA

Clonajes

1. Bier E. *The Coiled Spring. How life begins*. CSHL Press, New York. 2000.
2. Cibelli JB, Lanza RP, West MD, Ezzell C (2002) The first human cloned embryo. *Scientific American* **286** (1), 43-9.
3. Gurdon JB (1968) Transplanted nuclei and cell differentiation. *Scientific American* **219**, 24-35.
4. Gurdon JB (1977) The Croonian Lecture 1976: Egg cytoplasm and gene control in development. *Proc R Soc Lond B* **198**, 211-47.
5. Gurdon JB, Colman A (1999) The future of cloning. *Nature* **402**, 743-6.
6. Kolata G (1998) *Hello, Dolly. El nacimiento del primer clon*. Editorial Planeta SA, Barcelona.
7. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ y Campbell KHS (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* **385**, 810-3.

Células troncales

8. Annas GJ, Caplan A y Elias S (1999) Stem cell politics, ethics and medical progress. *Nature Med* **5**, 1339-41.
9. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM (2001) The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* **105**, 829-41.
10. Editorial; Frankel MS (2000) In search of stem cell policy. *Science* **287**, 1397.
11. Editorial: Weissman IL, Baltimore D (2001) Disappearing stem cells, disappearing science. *Science* **292**, 60.
12. Editorial: Berg P (2001) Progress with stem cells:

stuck or unstuck? *Science* **293**, 1953

13. Fuchs E, Segre JA (2000) Stem cells: a new lease of life. *Cell* **100** (1: Millennium revs), 143-56.
14. Keller G y Snodgrass HR (1999) Human embryonic stem cells: the future is now. *Nature Med* **5**, 151-2.
15. Kempermann G, Gage FH (may 1999) New nerve cells for the adult brain. *Scientific American* (5), 48-53.
16. Kirschstein R, Skirboll LR (2001) *Stem Cells: Scientific progress and future research directions*. National Institute of Health. USA.
17. Lanza RP, Caplan AL, Silver LM, Cibelli JB, West MD, Green RM (2000) The ethical validity of using nuclear transfer in human transplantation. *JAMA* **284**, 3175-9.
18. Lanza RP, Cibelli JB y West MD (1999) Human therapeutic cloning. *Nature Med* **5**, 975-7.
19. Lanza RP, Cibelli JB y West MD (1999) Prospects for the use of nuclear transfer in human transplantation. *Nature Biotech* **17**, 1171-4.
20. Marshak DR, Gardner RL, Gottlieb D (eds) (2001) *Stem Cell Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
21. McKay R (2000) Stem cells – hype and hope. *Nature* **406**, 361-4.
22. Orkin SH (2000) Stem cell alchemy. *Nature Med* **6**, 1212-3.
23. Petit-Zeman S (2001) Regenerative medicine. *Nature Biotech* **19**, 201-6.
24. Reubinoff BE, Pera MF, Fong C-Y, Trounson A, Bongso A (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotech* **18**, 399-404.
25. Robey PG (Ed) (2000) Series introduction: Stem cell near the century mark. Perspective: Series on stem cell biology. *J Clin Invest* **105**: 1489-91.
26. Shambrott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13726-31.
27. Snyder RY, Vescovi A (2000) The possibilities/plexities of stem cells. *Nature Biotech* **18**, 827-8.
28. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS y Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-7.
29. Wakayama T, Perry ACF, Zuccotti M, Johnson KR, Yanagimachi R (1998) Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* **394**, 369-74.
30. Weissman IL (2000) Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* **100** (2: Millennium revs), 157-68.

Ingeniería tisular

31. Bonadio J (2000) Tissue engineering via local gene delivery. *J Mol Med* **78**, 303-11.
32. Langer R, Vacanti JP (1993) Tissue engineering. *Science* **260**, 920-5.
33. Lanza RP, Langer R, Vacanti J (eds) (2000) *Principles of Tissue Engineering* (2nd ed). Academic Press, San Diego.
34. Vacanti JP, Langer R (1999) Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. *Lancet* **354** (suppl I), SI 32-4.
35. (eds) (april 1999) The promise of tissue engineering. *Scientific American* (4), 37-65.