

Es realmente difusa la barrera entre la revisión de la investigación de frontera de un tema especializado y una contribución para la actualización docente. Esta sección recoge artículos de revisión adecuados para la enseñanza.

Uso de las células troncales embrionarias en el tratamiento de diversas enfermedades en el humano

Fabián Díaz,¹ Iván Velasco,² Ignacio Camacho-Arroyo¹

Abstract

Pluripotent embryonic stem (ES) cells are derived from the inner cell mass of pre-implantation embryos called blastocysts, and can differentiate into all intraembryonic cell types. Mouse and human ES cells can be grown undifferentiated in culture for extended periods of time with genetic stability. Human ES cells could become a useful source for tissue aimed for cell replacement therapies in people, because they can produce terminally differentiated progeny. Thus, ES cells have recently gained a lot of interest in Medicine and Biology. In this paper, we summarize the advancements in the differentiation protocols to induce ES cells to become dopamine neurons, cardiomyocytes and insulin-producing cells. We also review the use of ES cells in animal models of Parkinson's disease, heart failure and type I diabetes. Our conclusion is that there are significant achievements in both the induction of differentiation, and in the application of ES cells derivatives in animals models of human disease, which might allow clinical translation in the long term.

Células troncales

Las células troncales (CT) también llamadas células madre tienen dos características que las distinguen de las demás células de un organismo: son células no especializadas que pueden auto-renovarse mediante la mitosis y en ciertas condiciones fisiológicas o

experimentales pueden diferenciarse a células con una función específica como neuronas, hepatocitos, células del cartilago, etc. (McKay, 2000).

Se han descrito dos tipos de CT, tanto en los animales como en el ser humano: las CT embrionarias (CTE) y obtenidas de tejido adulto. Ambas tienen características y funciones diferentes. Las CT de tejido adulto se hallan embebidas entre las células diferenciadas de tejidos y órganos, y su papel principal es mantener y reparar los tejidos en donde se encuentran. Normalmente estas CT son multipotentes, lo que significa que tienen cierto compromiso a formar células del tejido en donde se encuentran. CT adultas se han identificado en muchos tejidos como el cerebro, la médula ósea, el músculo esquelético, la piel, el intestino, etc. Sin embargo, su número es muy limitado y son difíciles de encontrar. Además, su rango de diferenciación está limitado al tipo de células de su tejido de origen: i.e. las CT neurales sólo podrán diferenciarse en células del tejido nervioso: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Wagers & Weissman, 2004).

Células troncales embrionarias (CTE)

El desarrollo de los mamíferos inicia con el cigoto totipotente, el cual es capaz de dar origen a todos los tejidos embrionarios, así como a parte de la placenta. Después de que el cigoto comienza a dividirse y durante la etapa de siete a ocho divisiones celulares, se da la formación del blastocisto, en el cual se distinguen dos importantes estructuras: 1) el trofoblasto (formado por la capa externa) el cual se va adherir a la pared uterina, y 2) la masa celular interna, formada por células pluripotentes capaces de formar a todos los tejidos y órganos del embrión. Es de esta última estructura de donde se han podido derivar las CTE (figura 1).

En 1981, los grupos de Martin Evans y Gail Martin aislaron por primera vez líneas celulares pluripotentes del blastocisto de ratón, a las cuales denominaron CTE (Evans y Kaufman, 1981; Martin, 1981). Estas células pueden ser mantenidas *in vitro* sin una pérdida aparente de sus capacidades totipotenciales, lo cual se puede evidenciar mediante estu-

¹ Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM,

² Departamento de Neurociencias, Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Recibido: 1 de junio de 2007; **aceptado:** 2 de noviembre de 2007.

* **Correspondencia:** Dr. Ignacio Camacho-Arroyo
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Coyoacán 04510, México DF.
Tel. (55) 56223869, Fax: (55) 5616 2010.

Correo electrónico: camachoarroyo@gmail.com
Dr. Iván Velasco Velázquez
Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 70-253, 04510 México D.F.
Tel. (55) 5622 5649, Fax: (55) 5622 5607.

Correo electrónico: ivelasco@ifc.unam.mx

dios de diferenciación en cultivo. Otra manera de probar su capacidad de diferenciación es mediante el implante subcutáneo en animales inmunosuprimidos, con lo que se generan teratomas (que son tumores con tejidos de endodermo, mesodermo y ectodermo). En el caso de las CTE de humano, éstas son obtenidas de embriones de menos de una semana, provenientes de las clínicas de fertilización *in vitro*, los cuales son donados específicamente para este objetivo por los padres, y ya no van a ser utilizados para ser implantados (Hovatta, 2006). De esta forma, en noviembre de 1998 el grupo de Thomson reportó el aislamiento y cultivo de cinco líneas de CTE de humano (Thomson *et al.*, 1998).

Una vez que se obtiene una línea celular de CTE, ésta debe de pasar una serie de pruebas en el laboratorio para corroborar que tenga las propiedades fundamentales de CTE, las cuales son mantenidas durante meses en cultivo, asegurándose así que se trata de células con una capacidad de auto-renovarse indiferenciadas en el largo plazo y se examinan sus cromosomas para verificar si no hay alguna alteración. En el caso de las células de ratón, la naturaleza pluripotente tiene que ser demostrada al ser inyectadas en blastocistos de la misma especie y observar su capacidad de contribuir (es decir, diferenciarse) a todos los tejidos del animal adulto, incluyendo los espermatozoides y los ovocitos (Bradley *et al.*, 1984); como se mencionó anteriormente, también deben probar su capacidad de formar células diferenciadas en cultivo (Smith, 2001).

Aunado a estas pruebas, el reconocimiento de la identidad de las CTE se ha logrado mediante el uso de marcadores moleculares y de superficie celular que son casi exclusivos de este tipo de células. Se ha descrito que las CTE de ratón indiferenciadas expresan el antígeno específico de etapa embrionaria SSEA-1 (el cual es un marcador en la membrana citoplásmica), los factores de transcripción Oct-4, Nanog, Sox-2, receptores de membrana gp130, además de poseer una alta expresión de fosfatasa alcalina y de telomerasa (Wobus & Boheler, 2005).

Las CTE humanas comparten ciertas propiedades con las líneas murinas, tales como mantener un estado indiferenciado y de auto-renovación por períodos prolongados de cultivo, además de que sus derivados clonales conservan un cariotipo normal (Amit *et al.*, 2000). La prueba de la pluripotencia en CTE de ratón, como ya se ha mencionado, es la contribución a diversos tejidos al inyectarse en embriones tempranos y la generación de ratones químe-

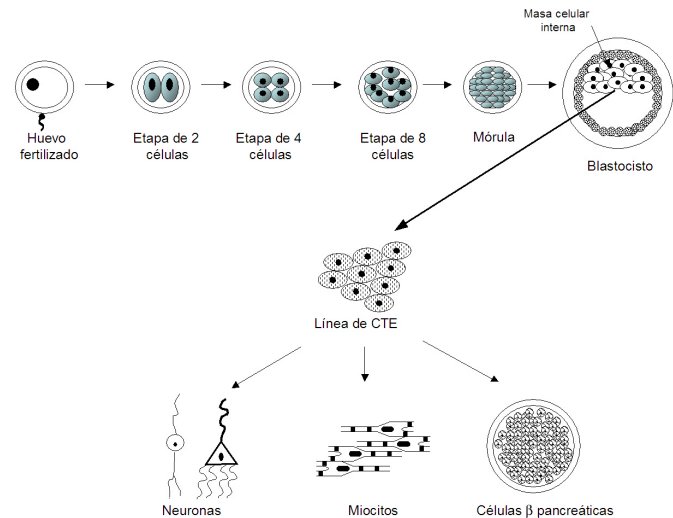


Figura 1. Obtención de las células troncales embrionarias (CTE) y su potencial de diferenciación. Se muestra el desarrollo embrionario normal del ratón o del humano hasta la etapa de blastocisto. Una vez formada esta estructura, es de la masa celular interna de donde se obtienen las células que se mantienen *in vitro* para obtener una línea de CTE. Posteriormente, mediante diversos protocolos de diferenciación (ver texto), las CTE pueden adquirir los fenotipos de células funcionales diferenciadas.

ricos; sin embargo, estas pruebas no se pueden realizar por razones éticas en las CTE humanas. De esta forma, el estándar más alto es la demostración de que las CTE humanas son capaces de diferenciarse a células de las tres capas embrionarias *in vitro*, y la formación de teratomas al ser inyectadas en ratones inmunodeficientes (Reubinoff *et al.*, 2000; Richards *et al.*, 2002).

Hasta 1987 no se sabía qué moléculas hacían que las CTE se mantuvieran indiferenciadas. Dado que la producción de CTE requiere una monocapa de fibroblastos embrionarios inactivados de ratón, se sugirió que éstos podrían producir factor(es) crítico(s) para la auto-renovación, o moléculas capaces de inhibir la diferenciación. De esta forma, dos grupos independientes identificaron al factor inhibidor de leucemia (LIF), como el elemento necesario para mantener el estado indiferenciado de las CTE de ratón (Smith *et al.*, 1988; Williams *et al.*, 1988). LIF es una glicoproteína soluble de la familia de la Interleucina-6, la cual actúa uniéndose al receptor de membrana gp130 para regular una variedad de funciones celulares a través de la vía de señalización de la proteína STAT (Aghajanova, 2004). De esta manera, la ausencia de LIF, la falta de fibroblastos embrionarios de ratón, o la inactivación de STAT3 tienen como consecuencia que las CTE se diferencien *in vitro* y pierdan su capacidad pluripotente (Boeuf *et al.*, 1997).

Además de la dependencia de LIF, se han des-

crita una serie de factores necesarios para que las CTE mantengan sus propiedades pluripotenciales. En primera instancia, un nivel regulado del factor de transcripción Oct-3/4, ya que un incremento en su expresión causa la diferenciación hacia endodermo y mesodermo, mientras su disminución induce la formación de trofoectodermo en las CTE (Niwa *et al.*, 2000). El regulador transcripcional Nanog también juega un papel determinante en mantener la auto-renovación de las CTE de ratón, independientemente de la vía de LIF; además, la eliminación del gen *nanog* tuvo como consecuencia la pérdida de la pluripotencialidad de las CTE murinas (Mitsui *et al.*, 2003).

En contraste con las células de ratón, el LIF es insuficiente para inhibir la diferenciación de las CTE humanas (Reubinoff *et al.*, 2000), las cuales deben ser co-cultivadas con fibroblastos embrionarios de ratón o de humano. La(s) señal(es) producida(s) por los fibroblastos para la auto-renovación en un estado indiferenciado de las CTE humanas permanece(n) sin ser identificada(s). No obstante, recientemente se han identificado algunos factores solubles que en combinación permiten la auto renovación de las CTE humanas (Ludwig *et al.*, 2006).

Diferenciación de las CTE

El método más empleado para la diferenciación en cultivo de las CTE es mediante la formación de estructuras esféricas tridimensionales en suspensión, denominadas cuerpos embrionarios (CE), debido a que expresan marcadores de las capas germinales presentes en el tejido embrionario post-implantado. Aunque la diferenciación de los CE no asemeja en todo al desarrollo embrionario, permite que las CTE se diferencien en derivados de las tres capas germinales embrionarias.

La diferenciación de las CTE inicia al cultivarlas como CE en ausencia de señales de auto-renovación. Se ha descrito recientemente que también el co-cultivo con líneas celulares provenientes de células estromales aisladas de la médula ósea, es capaz de diferenciar a las CTE *in vitro* (Kawasaki *et al.*, 2000).

Una vez que la diferenciación comienza, células representativas de las tres capas germinales primarias se desarrollan *in vitro*. Inicialmente, una capa externa de células de tipo endodermo se forma en los CE, seguida por la formación de un anillo ectodérmico y el subsecuente desarrollo de células del mesodermo. La transferencia de estos CE a cajas de cultivo en donde se pueden adherir, permite la diferenciación en una variedad de células especializadas

como células del miocardio, del músculo liso y esquelético, hematopoyéticas, pancreáticas, hepáticas, del tejido adiposo, cartilaginosas, neuronales, etc. Una característica muy importante de las células diferenciadas a partir de CTE es la expresión temporal de genes tejido-específicos, lo cual indica que los procesos tempranos del desarrollo *in vivo* son recapitulados *in vitro* (Leahy *et al.*, 1999). El tiempo de cultivo de los CE depende del tipo celular que se quiera obtener (Keller, 1995). Los precursores de mesodermo y ectodermo se forman en poco días, mientras que algunos tipos celulares del endodermo se benefician con periodos de tiempo más prolongados en donde los CE se vuelven quísticos (Abe *et al.*, 1996; Leahy *et al.*, 1999). También se ha descrito que la activina A y el factor de crecimiento transformante β principalmente inducen un fenotipo mesodérmico; el ácido retinoico, el factor de crecimiento epidérmico, las proteínas morfogénicas de hueso (BMP) y el factor de crecimiento fibroblástico, inducen la diferenciación en ectodermo y mesodermo, mientras que el factor de crecimiento neuronal promueve la diferenciación hacia derivados de las tres capas germinales (Itskovitz-Eldor *et al.*, 2000; Reubinoff *et al.*, 2000; Schuldiner *et al.*, 2000).

Terapias celulares

Durante el ciclo biológico de los seres vivos, se da una constante reparación de algunos tejidos mediante la diferenciación de CT. Sin embargo, durante el envejecimiento esta capacidad del organismo se ve deteriorada. La medicina regenerativa es una disciplina nueva que tiene como objetivo el restaurar tejidos y órganos dañados debido al envejecimiento o a enfermedades, por medio de terapias de reemplazo celular. En el caso de enfermedades en donde la causa principal es la muerte de un tipo celular específico, tales como la enfermedad de Parkinson, el daño al tejido cardíaco o la diabetes tipo I, el trasplante de células podría ser benéfico para los pacientes.

Uno de los problemas más importantes en el campo de los trasplantes es la falta de tejidos y órganos, los cuales se obtienen de cadáveres. Otro gran problema es la falta de tratamientos para el reemplazo, reparación o mejora de la función biológica de tejidos dañados, lo cual ha llevado a una búsqueda intensiva de fuentes alternativas de células. Las células donadoras para este tipo de terapias pueden provenir de tejidos autólogos (del mismo individuo), alogénicos (misma especie) y xenoinjer-

tos (diferente especie). En estas terapias se han utilizado líneas celulares y CT derivadas del adulto. Una fuente alternativa y prometedora para la generación de células para este tipo de terapias son las CTE, debido a las propiedades que ya se han mencionado en esta revisión, con las cuales se podría generar *in vitro* una cantidad muy importante de células. Sin embargo, la habilidad que tenemos a la fecha para cultivar, multiplicar y manipular estos tipos celulares es limitada y sólo se pueden usar en protocolos para un tratamiento específico (Gage, 1998).

El poder diferenciar CTE a múltiples linajes celulares abre la posibilidad de desarrollar nuevos conocimientos, no sólo en el campo de la Medicina, sino en el estudio del desarrollo embrionario de los mamíferos *in vitro*, como puede ser el análisis de los eventos que regulan las etapas tempranas tanto de inducción como especificación de los diferentes tipos celulares. Los experimentos que nos brinden este tipo de información son difíciles de realizar en el embrión de ratón y no se pueden realizar en el humano. Asimismo, el sistema de diferenciación de las CTE puede ser visto como un modelo novedoso y que aporta conocimientos valiosos para la obtención de fuentes ilimitadas de células para estudios de fármacos en células humanas, o para generar tejidos que podrían ser utilizados como fuentes de trasplante en el tratamiento de un amplio espectro de enfermedades. Nos enfocaremos principalmente en tres áreas que han mostrado avances en la diferenciación y el trasplante de células diferenciadas originadas de CTE.

Uso terapéutico de las CTE en la Enfermedad de Parkinson

La enfermedad de Parkinson (EP) se caracteriza por rigidez, bradicinesia, temblor en reposo e inestabilidad en la postura y afecta a miles de personas en todo el mundo. La sintomatología de la EP es causada por la pérdida selectiva y progresiva de las neuronas dopaminérgicas (NDA) localizadas en la *sustancia nigra pars compacta* del mesencéfalo. Esta disminución en las NDA conlleva una reducción en la cantidad del neurotransmisor dopamina (DA) liberado en el cuerpo estriado en el cerebro, lo que provoca los signos característicos de estos pacientes (Greenamyre & Hastings, 2004; Meissner *et al.*, 2004).

La generación de NDA a partir de CTE de ratón ha sido llevada a cabo por varios grupos de trabajo incluyendo el nuestro (Kawasaki *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Diaz *et al.*, 2007). Luego de la diferenciación dopaminérgica,

las NDA se transplantaron en ratas en las que se causó la muerte de las NDA endógenas para simular la EP. El trasplante de NDA en estos animales ocasionó la recuperación de parámetros bioquímicos, farmacológicos y conductuales en los animales lesionados hasta por ocho meses después del trasplante (Kim *et al.*, 2002; Rodriguez-Gomez *et al.*, 2007).

Recientemente el grupo de Roy transplantó NDA derivadas de CTE humanas mediante un protocolo similar al descrito, en ratas lesionadas con 6-hidroxi-DA y observó una mejoría en la función motora (Roy *et al.*, 2006). Todavía no hay datos de ensayos clínicos de trasplante de NDA humanas, debido sobre todo a que existe la posibilidad de la formación de teratomas si se inducen en el trasplante de CTE indiferenciadas como se observó en un modelo animal (Bjorklund *et al.*, 2002). Los ensayos de bioseguridad son un requisito indispensable para asegurar que no hay riesgos intrínsecos al usar CTE humanas.

Uso terapéutico de las CTE como fuente de obtención de cardiomiocitos

Se ha reportado que los cardiomiocitos pueden ser transplantados tanto en corazones adultos normales o lesionados y que estas células transplantadas pueden formar un sincicio con los cardiomiocitos hospederos. Por otra parte, se ha demostrado que las CTE pueden diferenciarse en cardiomiocitos funcionales *in vitro* los cuales pueden formar injertos intracardiacos cuando son transplantados (Germani *et al.*, 2007). De esta forma, las CTE pueden ser una fuente para terapias de reemplazo al sustituir las células dañadas en enfermedades cardiacas tales como el infarto del miocardio. Los cardiomiocitos han sido derivados a partir de CTE en varios laboratorios. Los análisis moleculares y electrofisiológicos han indicado que se pueden diferenciar a células del atrio, ventrículo y sistemas de conducción del corazón. Además, estas células al diferenciarse reproducen tanto al desarrollo embrionario, como la expresión de genes de los cardiomiocitos terminalmente diferenciados (Alperin *et al.*, 2007).

Como se mencionó anteriormente, es indispensable la presencia de factores de crecimiento para la diferenciación de CTE humanas hacia cardiomiocitos, tales como el factor de crecimiento transformante β , las proteínas BMP, factores de crecimiento fibroblástico y la familia de WNT (Wei *et al.*, 2005). No se sabe con certeza cuáles son los mecanismos

involucrados en esta diferenciación; sin embargo, se ha sugerido la participación fundamental de las vías de señalización de las proteínas BMP y Notch para la inducción hacia mesodermo de las CTE y su posterior diferenciación hacia cardiomiocitos (Yuasa *et al.*, 2005).

La primera demostración de la diferenciación de CTE de ratón hacia células de músculo cardíaco fue hecha por el grupo encabezado por Field, en este trabajo los cardiomiocitos fueron inyectados en el miocardio del ventrículo de ratones adultos y encontraron que las células sobrevivieron por lo menos siete semanas sin encontrar la formación de ningún tumor (Klug *et al.*, 1996). Posteriormente el grupo de Min reportó una mejoría en la función ventricular izquierda de ratas con infarto del miocardio después de transplantar células derivadas de CTE. Asimismo, estas células expresaban marcadores de miocardiocitos como la actina, la cadena pesada de la miosina y la troponina I (Min *et al.*, 2002).

Por lo que se refiere al uso de CTE humanas y su diferenciación hacia cardiomiocitos, el grupo de Murry transplantó CTE humanas en el miocardio de ratones inmunodeficientes. Encontraron la formación de tejido miocárdico de origen humano y angiogénesis. Estas células podían proliferar hasta un mes después de ser transplantadas (Laflamme *et al.*, 2005). En este mismo contexto, el grupo de Gepstein, generó cardiomiocitos excitables a partir de CTE humanas y observaron una integración estructural, eléctrica y mecánica cuando eran co-cultivadas con células cardíacas de rata *in vitro*, que al transplantarlas en cerdos con un bloqueo cardíaco completo, se integraban y podían conducir los impulsos eléctricos hacia el ventrículo (Kehat *et al.*, 2004).

Recientemente, el grupo de Fleischmann determinó en un modelo animal de infarto de miocardio el tipo celular más adecuado para realizar terapias de reemplazo en el corazón. Comparó dos poblaciones de cardiomiocitos obtenidos de diferentes tipos de CT: de la medula ósea adulta (las cuales han sido sugeridas como una fuente para terapia de reemplazo celular) y CTE. Encontraron que sólo las CTE tenían el potencial de restaurar la función contráctil, mientras que las CT de la medula ósea de la tibia no tuvieron efectos benéficos en la función cardíaca. Además, estas últimas no contribuyeron a la generación de nuevo músculo cardíaco, liso o células endoteliales (Kolossov *et al.*, 2006).

Todos estos resultados validan el uso potencial de los cardiomiocitos derivados de las CTE para la

terapia cardíaca; a pesar de esto, no se han podido establecer protocolos de diferenciación que generen una población pura de cardiomiocitos.

Uso de las CTE en la diabetes

La diabetes representa uno de los objetivos más atractivos para la terapia celular utilizando CTE o sus derivados (revisado en Díaz *et al.*, 2005). Esta enfermedad crónica es caracterizada por una falla en la homeostasis de la glucosa, resultando en una variedad de complicaciones. La diabetes tipo I resulta de la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas residentes en los islotes de Langerhans (Bach, 1994). El reemplazo de las células β en estos pacientes podría proporcionarles una cura total, siempre que se pueda controlar la reacción inmune que ocasionó la muerte de las células pancreáticas originales.

La formación de las células β pancreáticas en el embrión involucra la expresión de factores transcripcionales que dirigen a las células precursoras endocrinas a madurar hacia células que producen insulina. Como las CTE son pluripotentes, se ha reportado que la diferenciación de CTE murinas *in vitro* genera solamente el 0.1% de la población total de células con características similares a las células productoras de insulina (Shiroi *et al.*, 2002). Sin embargo, este porcentaje se incrementa si se selecciona a las células progenitoras. De esta forma, se han descrito varios protocolos para la generación de células de islote pancreático a partir de CTE en cultivo. El primero, un protocolo de cinco pasos, es una adaptación del protocolo que se utiliza para la diferenciación hacia linaje neuronal e involucra al factor de crecimiento fibroblástico.

De este modo, se obtuvieron agregados de células que asemejan a los islotes pancreáticos, que contenían células inmunorreactivas a insulina, glucagon o somatostatina capaces de secretar insulina en respuesta a una concentración elevada de glucosa. Sin embargo, el contenido de insulina era bajo, además cuando se probó su función *in vivo* en un modelo de ratones diabéticos inducido por estreptozotocina, las células transplantadas no pudieron corregir la hiperglicemia (Lumelsky *et al.*, 2001). Un estudio posterior no pudo reproducir estos resultados (Rajagopal *et al.*, 2003), lo que hace evidente que factores aún no controlados pueden interferir en el protocolo de diferenciación.

De hecho, trabajos posteriores han postulado que la secreción de insulina por estas células puede ser un artefacto. Dado que los cultivos de CTE descritos anteriormente contienen neuronas y es posible

que algunas de las células productoras de insulina detectadas sean derivadas del linaje neuronal. Además, se ha planteado la posibilidad de que células inmunorreactivas a insulina no la produzcan, sino la tomen del medio del cultivo (Rajagopal *et al.*, 2003; Sipione *et al.*, 2004; Paek *et al.*, 2005). Estas células derivadas de CTE podrían liberar insulina al medio cuando las células sufren apoptosis o estrés (Rajagopal *et al.*, 2003).

Blyszczuk y colaboradores modificaron este protocolo cultivando CTE en presencia de activina B, exendina-4 y nicotinamida, lo cual desarrolló poblaciones celulares que expresaban el gen de insulina I. Además, estas células eran positivas para el péptido C, lo cual indica que la insulina detectada era producida por estas células; y al ser trasplantadas, estas células pudieron normalizar los niveles de glucosa sanguínea en el modelo de ratón diabético inducido por estreptozotocina (Blyszczuk *et al.*, 2003).

Un segundo método para la generación de estructuras con apariencia de islotes, fue el desarrollar una población heterogénea derivada de CTE, para posteriormente ser inducidas por suero. Este método ha producido un número escaso de células que muestran características de células tipo β como la presencia del péptido C y de gránulos de insulina dentro de la célula (Kahan *et al.*, 2003). Para tratar de enriquecer a las células tipo β de este tipo de cultivos, se ha desarrollado la estrategia de selección basada en la expresión del gen que confiere resistencia a neomicina dirigido por el promotor de insulina. La selección de los cultivos permitió el aislamiento de clones secretores de insulina que contenían a la hormona en niveles similares a los encontrados en islotes pancreáticos de animales normales. Cuando estas colonias se inyectaron a ratones diabéticos, corrigieron los niveles de glucosa sérica de esos animales hasta por 12 semanas. Sin embargo, más allá de este tiempo un número significativo de animales regresaron a sus niveles hiperglicémicos, indicando que las células son incapaces de proporcionar una recuperación a largo plazo (Soria *et al.*, 2000). De manera similar, la selección de linaje utilizando CTE que expresan el gen de resistencia a neomicina dirigido por el promotor del gen *nkx6.1* pudo ser aprovechada para generar células productoras de insulina, las cuales normalizaron la glicemia hasta 16 días después de ser trasplantadas en animales diabéticos (Leon-Quinto *et al.*, 2004).

Por otra parte, estudios iniciales con CTE humanas indican que la diferenciación *in vitro* genera el

1% de células secretoras de insulina que muestran características de células endócrinas pancreáticas (Assady *et al.*, 2001). Recientemente se ha descrito otro protocolo para la diferenciación de células productoras de insulina a partir de CTE humanas, el cual se basa en el protocolo de cinco pasos descrito anteriormente, en donde los CE son cultivados en medio libre de suero adicionado con fibronectina, para posteriormente cambiarse a medio N2 adicionado con FGF-2. Al final de esta etapa se retira el FGF-2, se adiciona nicotinamida y la concentración de glucosa es reducida en el medio. Finalmente, las células se disocian y crecen en suspensión, lo cual resulta en la formación de cúmulos con una alta secreción de insulina (además de encontrarse glucagón o somatostatina), lo cual sugiere una similitud con células pancreáticas inmaduras (Segev *et al.*, 2004). Recientemente, un protocolo similar produjo células que secretan insulina *in vivo* al ser trasplantadas en ratones diabéticos, con la consecuente corrección de los altos niveles de glucosa (Shim *et al.*, 2007). En este estudio, la remoción del trasplante ocasionó que los animales se volvieran diabéticos nuevamente, estableciéndose de este modo que las células trasplantadas eran las secretoras de insulina.

Perspectivas

Aunque los datos mencionados anteriormente nos dan una idea de la capacidad de las CTE de ratón y humano para diferenciarse en NDA, cardiomiocitos y células β pancreáticas, todavía no es claro si la progenie derivada de las CTE humanas podrían tener una función a largo plazo en el cuerpo humano. Sin embargo, el potencial de desarrollo *in vitro* y el éxito de las CTE en modelos animales demuestran el potencial uso de células derivadas de CTE humanas como una fuente para terapias de trasplante en el humano. Antes de emprender esta ardua tarea, se deben vencer un número de obstáculos, como son la derivación eficiente de CTE humanas en la ausencia de células animales y comprender los cambios genéticos y epigenéticos que ocurren durante los cultivos *in vitro*. Debemos contar con métodos eficientes para la purificación de células diferenciadas, ya sea mediante la manipulación genética (si las células son modificadas debemos tener extremo cuidado en vigilar los posibles cambios en el cariotipo y su capacidad para diferenciarse en el fenotipo deseado), o mediante la utilización de marcadores de superficie. Asimismo, las células una vez trasplantadas deben de ser funcionales dentro del organismo.

Finalmente, debemos asegurarnos de que no haya la formación de tumores derivados de CTE y que exista la inmunocompatibilidad entre donadores y receptores. En el largo plazo, probablemente se pueden realizar trasplantes de células diferenciadas a partir de CTE clonadas mediante la transferencia nuclear de una célula somática de pacientes. El donador de la célula somática podría ser el propio paciente o un familiar cercano que sea histocompatible. Este procedimiento no asegura que las células transplantadas vayan a sobrevivir y continuar funcionando por periodos prolongados, pero sería un gran avance en cuanto a la disponibilidad de células humanas para trasplantes con lo que no se dependería de donadores cadavéricos o xenoinjertos. ▀

Agradecimientos

Fabián Díaz es becario postdoctoral del Conacyt. El trabajo en el laboratorio de I.V. es financiado por Papiit (UNAM), Conacyt, Fundación Alemán y los National Institutes of Health de los EUA.

Bibliografía

- Abe, K., Niwa, H., Iwase, K., Takiguchi, M., Mori, M., Abe, S.I., Abe, K. & Yamamura, K.I., Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies, *Exp Cell Res*, **229**, 27-34, 1996.
- Aghajanova, L., Leukemia inhibitory factor and human embryo implantation, *Ann N Y Acad Sci*, **1034**, 176-183, 2004.
- Alperin, C., Zandstra, P.W. & Woodhouse, K.A., Engineering cardiac healing using embryonic stem cell-derived cardiac cell seeded constructs, *Front Biosci*, **12**, 3694-3712, 2007.
- Amit, M., Carpenter, M.K., Inokuma, M.S., Chiu, C.P., Harris, C.P., Waknitz, M.A., Itskovitz-Eldor, J. & Thomson, J.A., Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol*, **227**, 271-278, 2000.
- Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor, J., Skorecki, K.L. & Tzukerman, M., Insulin production by human embryonic stem cells, *Diabetes*, **50**, 1691-1697, 2001.
- Bach, J.F., Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease, *Endocr Rev*, **15**, 516-542, 1994.
- Bjorklund, L.M., Sanchez-Pernaute, R., Chung, S., Andersson, T., Chen, I.Y., McNaught, K.S., Brownell, A.L., Jenkins, B.G., Wahlestedt, C., Kim, K.S. & Isacson, O., Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model, *Proc Natl Acad Sci USA*, **99**, 2344-2349, 2002.
- Blyszczuk, P., Czyz, J., Kania, G., Wagner, M., Roll, U., St-Onge, L. & Wobus, A.M., Expression of Pax4 in embryonic stem cells promotes differentiation of nestin-positive progenitor and insulin-producing cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 998-1003, 2003.
- Boeuf, H., Hauss, C., Graeve, F.D., Baran, N. & Keding, C., Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells, *J Cell Biol*, **138**, 1207-1217, 1997.
- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M.H. & Robertson, E., Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines, *Nature*, **309**, 255-256, 1984.
- Chung, S., Sonntag, K.C., Andersson, T., Bjorklund, L.M., Park, J.J., Kim, D.W., Kang, U.J., Isacson, O. & Kim, K.S., Genetic engineering of mouse embryonic stem cells by Nurr1 enhances differentiation and maturation into dopaminergic neurons, *Eur J Neurosci*, **16**, 1829-1838, 2002.
- Diaz, N.F., Guerra-Arraiza, C., Diaz-Martinez, N.E., Salazar, P., Molina-Hernandez, A., Camacho-Arroyo, I. & Velasco, I., Changes in the content of estrogen alpha and progesterone receptors during differentiation of mouse embryonic stem cells to dopamine neurons, *Brain Res Bull*, **73**, 75-80, 2007.
- Diaz, F., Camacho-Arroyo, I. & Velasco, I., Posible uso terapéutico de las células troncales embrionarias como fuente de células β pancreáticas, *Revista de Endocrinología y Nutrición*, **13**, 132-139, 2005.
- Evans, M.J. & Kaufman, M.H., Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, *Nature*, **292**, 154-156, 1981.
- Gage, F.H., Cell therapy, *Nature*, **392**, 18-24, 1998.
- Germani, A., Di Rocco, G., Limana, F., Martelli, F. & Capogrossi, M.C., Molecular mechanisms of cardiomyocyte regeneration and therapeutic outlook, *Trends Mol Med*, **13**, 125-133, 2007.
- Greenamyre, J.T. & Hastings, T.G., Biomedicine. Parkinson's-divergent causes, convergent mechanisms, *Science*, **304**, 1120-1122, 2004.
- Hovatta, O., Derivation of human embryonic stem cell lines, towards clinical quality, *Reprod Fertil Dev*, **18**, 823-828, 2006.
- Itskovitz-Eldor, J., Schuldiner, M., Karsenti, D., Eden, A., Yanuka, O., Amit, M., Soreq, H. &

- Benvenisty, N., Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers, *Mol Med*, **6**, 88-95, 2000.
- Kahan, B.W., Jacobson, L.M., Hullett, D.A., Ochoada, J.M., Oberley, T.D., Lang, K.M. & Odorico, J.S., Pancreatic precursors and differentiated islet cell types from murine embryonic stem cells: an in vitro model to study islet differentiation, *Diabetes*, **52**, 2016-2024, 2003.
- Kawasaki, H., Mizuseki, K., Nishikawa, S., Kaneko, S., Kuwana, Y., Nakanishi, S., Nishikawa, S.I. & Sasai, Y., Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity, *Neuron*, **28**, 31-40, 2000.
- Kehat, I., Khimovich, L., Caspi, O., Gepstein, A., Shofti, R., Arbel, G., Huber, I., Satin, J., Itskovitz-Eldor, J. & Gepstein, L., Electromechanical integration of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, **22**, 1282-1289, 2004.
- Keller, G.M., In vitro differentiation of embryonic stem cells, *Curr Opin Cell Biol*, **7**, 862-869, 1995.
- Kim, J.H., Auerbach, J.M., Rodriguez-Gomez, J.A., Velasco, I., Gavin, D., Lumelsky, N., Lee, S.H., Nguyen, J., Sanchez-Pernaute, R., Bankiewicz, K. & McKay, R., Dopamine neurons derived from embryonic stem cells function in an animal model of Parkinson's disease, *Nature*, **418**, 50-56, 2002.
- Klug, M.G., Soonpaa, M.H., Koh, G.Y. & Field, L.J., Genetically selected cardiomyocytes from differentiating embryonic stem cells form stable intracardiac grafts, *J Clin Invest*, **98**, 216-224, 1996.
- Kolossov, E., Bostani, T., Roell, W., Breitbach, M., Pillekamp, F., Nygren, J.M., Sasse, P., Rubenchik, O., Fries, J.W., Wenzel, D., Geisen, C., Xia, Y., Lu, Z., Duan, Y., Kettenhofen, R., Jovinge, S., Bloch, W., Bohlen, H., Welz, A., Hescheler, J., Jacobsen, S.E. & Fleischmann, B.K., Engraftment of engineered ES cell-derived cardiomyocytes but not BM cells restores contractile function to the infarcted myocardium, *J Exp Med*, **203**, 2315-2327, 2006.
- Lafamme, M.A., Gold, J., Xu, C., Hassanipour, M., Rosler, E., Police, S., Muskheli, V. & Murry, C.E., Formation of human myocardium in the rat heart from human embryonic stem cells, *Am J Pathol*, **167**, 663-671, 2005.
- Leahy, A., Xiong, J.W., Kuhnert, F. & Stuhlmann, H., Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation, *J Exp Zool*, **284**, 67-81, 1999.
- Lee, S.H., Lumelsky, N., Studer, L., Auerbach, J.M. & McKay, R.D., Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells, *Nat Biotechnol*, **18**, 675-679, 2000.
- Leon-Quinto, T., Jones, J., Skoudy, A., Burcin, M. & Soria, B., In vitro directed differentiation of mouse embryonic stem cells into insulin-producing cells, *Diabetologia*, **47**, 1442-1451, 2004.
- Ludwig, T.E., Levenstein, M.E., Jones, J.M., Berggren, W.T., Mitchen, E.R., Frane, J.L., Crandall, L.J., Daigh, C.A., Conard, K.R., Piekarczyk, M.S., Llanas, R.A. & Thomson, J.A., Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions, *Nat Biotechnol*, **24**, 185-187, 2006.
- Lumelsky, N., Blondel, O., Laeng, P., Velasco, I., Ravin, R. & McKay, R., Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets, *Science*, **292**, 1389-1394, 2001.
- Martin, G.R., Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 7634-7638, 1981.
- McKay, R., Stem cells-hype and hope, *Nature*, **406**, 361-364, 2000.
- Meissner, W., Hill, M.P., Tison, F., Gross, C.E. & Bezard, E., Neuroprotective strategies for Parkinson's disease: conceptual limits of animal models and clinical trials, *Trends Pharmacol Sci*, **25**, 249-253, 2004.
- Min, J.Y., Yang, Y., Converso, K.L., Liu, L., Huang, Q., Morgan, J.P. & Xiao, Y.F., Transplantation of embryonic stem cells improves cardiac function in postinfarcted rats, *J Appl Physiol*, **92**, 288-296, 2002.
- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. & Yamanaka, S., The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells, *Cell*, **113**, 631-642, 2003.
- Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A.G., Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells, *Nat Genet*, **24**, 372-376, 2000.
- Paek, H.J., Morgan, J.R. & Lysaght, M.J., Sequestration and synthesis: the source of insulin in cell clusters differentiated from murine embryonic stem cells, *Stem Cells*, **23**, 862-867, 2005.

- Rajagopal, J., Anderson, W.J., Kume, S., Martinez, O.I. & Melton, D.A., Insulin staining of ES cell progeny from insulin uptake, *Science*, **299**, 363, 2003.
- Reubinoff, B.E., Pera, M.F., Fong, C.Y., Trounson, A. & Bongso, A., Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro, *Nat Biotechnol*, **18**, 399-404, 2000.
- Richards, M., Fong, C.Y., Chan, W.K., Wong, P.C. & Bongso, A., Human feeders support prolonged undifferentiated growth of human inner cell masses and embryonic stem cells, *Nat Biotechnol*, **20**, 933-936, 2002.
- Rodriguez-Gomez, J.A., Lu, J.Q., Velasco, I., Rivera, S., Zoghbi, S.S., Liow, J.S., Musachio, J.L., Chin, F.T., Toyama, H., Seidel, J., Green, M.V., Thanos, P.K., Ichise, M., Pike, V.W., Innis, R.B. & McKay, R.D., Persistent dopamine functions of neurons derived from embryonic stem cells in a rodent model of Parkinson disease. *Stem Cells*, **25**, 918-928, 2007.
- Roy, N.S., Cleren, C., Singh, S.K., Yang, L., Beal, M.F. & Goldman, S.A., Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes, *Nat Med*, **12**, 1259-1268, 2006.
- Schuldiner, M., Yanuka, O., Itskovitz-Eldor, J., Melton, D.A. & Benvenisty, N., Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 11307-11312, 2000.
- Segev, H., Fishman, B., Ziskind, A., Shulman, M. & Itskovitz-Eldor, J., Differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing clusters, *Stem Cells*, **22**, 265-274, 2004.
- Shim, J.H., Kim, S.E., Woo, D.H., Kim, S.K., Oh, C.H., McKay, R. & Kim, J.H., Directed differentiation of human embryonic stem cells towards a pancreatic cell fate, *Diabetologia*, **50**, 1228-1238, 2007.
- Shiroi, A., Yoshikawa, M., Yokota, H., Fukui, H., Ishizaka, S., Tatsumi, K. & Takahashi, Y., Identification of insulin-producing cells derived from embryonic stem cells by zinc-chelating dithione, *Stem Cells*, **20**, 284-292, 2002.
- Sipione, S., Eshpeter, A., Lyon, J.G., Korbitt, G.S. & Bleackley, R.C., Insulin expressing cells from differentiated embryonic stem cells are not beta cells, *Diabetologia*, **47**, 499-508, 2004.
- Smith, A.G., Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **17**, 435-462, 2001.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M. & Rogers, D., Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides, *Nature*, **336**, 688-690, 1988.
- Soria, B., Roche, E., Berna, G., Leon-Quinto, T., Reig, J.A. & Martin, F., Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice, *Diabetes*, **49**, 157-162, 2000.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S. & Jones, J.M., Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, *Science*, **282**, 1145-1147, 1998.
- Wagers, A.J. & Weissman, I.L., Plasticity of adult stem cells, *Cell*, **116**, 639-648, 2004.
- Wei, H., Juhasz, O., Li, J., Tarasova, Y.S. & Boheler, K.R., Embryonic stem cells and cardiomyocyte differentiation: phenotypic and molecular analyses, *J Cell Mol Med*, **9**, 804-817, 2005.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A. & Gough, N.M., Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells, *Nature*, **336**, 684-687, 1988.
- Wobus, A.M. & Boheler, K.R., Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy, *Physiol Rev*, **85**, 635-678, 2005.
- Yuasa, S., Itabashi, Y., Koshimizu, U., Tanaka, T., Sugimura, K., Kinoshita, M., Hattori, F., Fukami, S., Shimazaki, T., Ogawa, S., Okano, H. & Fukuda, K., Transient inhibition of BMP signaling by Noggin induces cardiomyocyte differentiation of mouse embryonic stem cells, *Nat Biotechnol*, **23**, 607-611, 2005.