



Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla
Centro Interdisciplinario de Posgrados
Investigación y Consultoría
Departamento de Ingeniería Industrial y Tecnologías de
Información
Doctorado en Ingeniería Biomédica

Terapia celular en modelos de leucemia mielocítica crónica
inducida in vitro con el empleo de CD3(+)CD56(+) con células K562

Tesis que para obtener el Grado de Doctor
en Ingeniería Biomédica

Presenta

Isaac Osadolor Osademwigie

Puebla, México.

2010



UPAEP – Secretaría General

Dirección General de Apoyos Académicos

Dirección del Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación.

Biblioteca Central - **Karol Wojtyla**

Tesis Digitales Restricciones de uso:

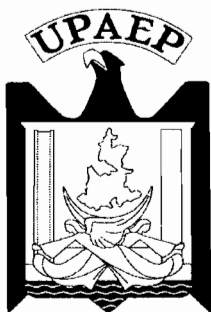
DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de textos, imágenes, gráficas, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente de donde la obtuvo mencionando el autor o autores involucrados en el documento.

Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla

Centro Interdisciplinario de Posgrados

Investigación y Consultoría

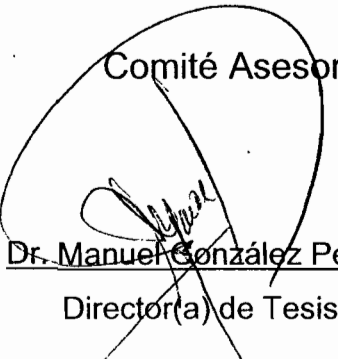
Ingeniería Biomédica

Doctorado en Ingeniería Biomédica

Se aprueba la Tesis:

**Terapia Celular en Modelos de Leucemia Mielocítica Crónica
Inducida *in Vitro* con el empleo de CD3(+)CD56(+) con células K562**

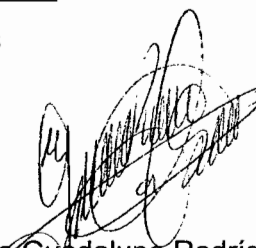
Comité Asesor


Dr. Manuel González Pérez

Director(a) de Tesis


Dra. María Laura Sánchez Huerta

Asesor(a)


Dra. Magdalena Guadalupe Rodríguez Santiago

Asesor(a)

Puebla, México.

26 de abril de 2010

"Los hombres deberían saber que del cerebro, y nada más que del cerebro, vienen las alegrías, el placer, la risa y la diversión, las penas, el dolor, el abatimiento y las lamentaciones. Y gracias al cerebro, de manera especial, adquirimos sabiduría y conocimientos, y vemos, oímos y sabemos lo que es repugnante y lo que es bello, lo que es malo y lo que es bueno, lo que es dulce y lo que es insípido... Y gracias a este órgano nos volvemos locos y deliramos, y los miedos y terrores nos asaltan... Debemos soportar todo esto cuando el cerebro no está sano... Y en este sentido soy de la opinión de que esta víscera ejerce en el ser humano el mayor poder."

Hipócrates, 460-377 a. C.

"Nosotros somos la encarnación local del Cosmos que ha crecido hasta tener conciencia de sí."

Carl Sagan, 1980

RESUMEN

La presente investigación estudió el efecto de CD3(+)CD56(+) en células K562 in vitro y analizó la capacidad citotóxica, citolítica y apoptótica. Las CD3(+) y CD56(+) no lograron crecer apropiadamente en medio sin 2-mercapto etanol en el día de cultivo por lo cual la curva de crecimiento de cada una se disminuía cada hora. Las K562 tuvieron un crecimiento drástico en todos los ensayos de la investigación. No hubo inhibición de K562 por CD3(+)CD56(+) con una concentración celular baja y lo contrario sucedió al aumentar la concentración celular a 300 μ L produciendo una apoptosis importante y provocó la fragmentación de DNA de las células K562. El hallazgo demostró la importancia de la capacidad apoptótica de CD3(+)CD56(+) en las células cancerosas. Antes de la absorbancia el conteo celular de CD3(+) fue de 2,390,000 células/mL, mientras tanto de CD56(+) era de 840,000 células/mL. El estudio demostró mucha importancia clínica in vitro y por lo tanto requiere ser realizado in vivo.

ABSTRACT

The present research studied the effect of CD3(+)CD56(+) on K562 cell lines in vitro and analyzed their cytotoxic, cytolytic and apoptotic capacity. There was no appropriate growth of CD3(+)CD56(+) without 2-mercaptoethanol on day 1 and hence the growth curve was in decrease every hour. The expansion of K562 was always very drastic in all the assays during the research. There was no inhibition of K562 with low cellular concentration of CD3(+)CD56(+). However, an apoptotic induction occurred with 300 μ L of CD3(+)CD56(+) producing the fragmentation of the DNA of K562. The research demonstrated the importance of the apoptotic capacity of CD3(+)CD56(+) against cancer cells. Before the result of the absorbance the cell count of CD3(+), was 2,390,000 células/mL, while that of the CD56(+) was 840,000 células/mL. This study demonstrated a lot of clinical importance in vitro and hence it is recommended to be realized in vivo.

ÍNDICE	
RESUMEN/ABSTRACT	I
INTRODUCCIÓN	1
1.- CELULAS	5
1.1.- Definición y propiedades generales	5
1.1.1.- Compartimentación celular	7
1.1.2.- Citoesqueleto	9
1.1.3.- Centríolos	10
1.1.4.- Núcleo	10
1.1.5.- El retículo endoplásmico	11
1.1.6.- El aparato de Golgi	12
1.1.7.- Las mitocondrias	13
1.1.8.- Los lisosomas	14
1.1.9.- Los microtúbulos y los microfilamentos	14
1.1.10.- La división celular	15
1.1.10.1.- Mitosis	15
1.1.10.2.- Meiosis	17
1.1.10.3.- Regulación intracelular	19
1.1.10.4.- Punto de restricción	22
1.1.10.5.- Puntos de control	23
1.1.10.6.- Control extracelular del ciclo celular	26
1.1.11.- Apoptosis	28
1.1.11.1.- Receptores de membrana celular que median apoptosis	29

	III
1.1.11.2.- Mecanismos bioquímicos de la apoptosis	31
1.1.11.3.- Genes involucrados en la apoptosis familia de genes bcl-2	31
1.1.11.4.- Otros genes en apoptosis	32
1.1.11.5.- PAppel de la apoptosis en el sistema inmunitario	34
1.1.12.- El citosol	35
1.2.- Teoría celular	35
1.2.1.- Generalidades	35
1.2.2.- Historia de la teoría celular	37
1.2.3.- El impacto de la teoría celular en biología molecular	38
1.3.- Células madre	38
1.3.1.- Definición y propiedades	40
1.3.2.- Tipos y orígenes	42
1.3.3.- Células madre embrionarias	42
1.3.4.- Células embrionarias germinales	44
1.3.5.- Células embrionarias de carcinoma	45
1.3.6.- Células madre de origen fetal y adulto	45
1.3.6.1.- Las similitudes y diferencias entre las células madre embrionarias y adultas	46
1.3.6.2.- Plasticidad de las células madre adultas	47
1.3.6.3.- Papel en la renovación celular del organismo	48
1.3.7.- Terapias de sustitución celular	48
1.3.7.1.- Obtención y manipulación de células madre	49
1.3.8.- Diferenciación de células madre	50

1.3.9.- El debate sobre el uso terapéutico de las células madre	51
1.4.- Leucemia	53
1.4.1.- Antecedentes históricos	53
1.4.2.- Etiología	55
1.4.2.1.- Etiología infecciosa	55
1.4.2.2.- Etiología genética	55
1.4.2.3.- Etiología física	56
1.4.2.4.- Etiología química	56
1.4.3.- Diagnóstico de las leucemias	57
1.4.4.- Sintomatología de las leucemias	57
1.4.5.- Tipos de leucemia	57
1.4.5.1.- Leucemia linfocítica aguda (LLA)	57
1.4.5.2.- Leucemia linfocítica crónica (LLC)	58
1.4.5.3.- Leucemia mielocítica crónica (LMC)	58
1.4.5.3.1.- Biología molecular	59
1.4.5.3.2.- Características clínicas y diagnóstico	62
1.4.5.3.3.- Estrategia terapéutica	63
1.4.5.3.4.-Transplante alogénico de células madre	64
1.4.5.3.5.- Trasplante de células madre con condicionamiento de baja intensidad (o no mieloablativo)	65
1.4.5.3.6.- Tratamiento de recidiva de LMC post SCT	66
1.4.5.3.7.- Trasplante autólogo de células madre	66
1.4.5.4.- Leucemia linfocítica crónica (LLC)	67

1.4.5.5.- Leucemia de células pilosas	68
1.5. - Lineas celulares	68
1.5.1.- Propiedades de K562	68
1.5.2.- Cultivo de células tumorales K562	69
1.5.2.1.- Mantenimiento de la línea celular K562	71
1.5.3.- Propiedades de CD3	71
1.5.4.- Propiedades de CD56	73
1.6.- Terapias celulares basadas en células madre (CD3(+))CD56(+)) para la leucemia mielocítica crónica (LMC)	74
1.6.1.- Generalidades	74
1.6.2.- Breve historia de la terapia celular	75
1.6.2.1.- Historia del instituto católico de terapia celular	78
1.6.2.2.- Historia de las células madre	78
1.6.3.- las células del cordón umbilical pueden ser útiles en el tratamiento de la leucemia	79
1.6.4.- La terapia celular y la investigación sobre el embrión	79
1.6.5.- El clonaje o la clonación terapéutica	80
1.6.6.- Preguntas sobre las células madre	83
1.6.7.- Ingeniería de las células madre	85
1.6.7.1.- Generalidades	85
1.6.7.2.- Conceptos y procedimientos	85
1.6.7.3.- Terapia con genes	86
1.6.7.3.1.- Plasticidad	87
1.6.7.3.2.- Transdiferenciación	87
1.6.7.3.3.- Fusión	87

	VI
1.6.7.4.- Fenotipo de las células madre	88
1.6.7.5.- Tipos de células madre	88
1.6.7.5.1.- Embrionarias	88
1.6.7.5.2.- Somáticas pos-natales	90
1.6.7.6.- Aplicaciones clínicas	91
1.6.7.6.1.- Transplante de células hematopoyéticas	91
1.6.7.6.2.- Reconstitución de tejidos	92
1.6.8.- Avances en la terapia celular en el mundo	93
1.6.9.- Indicaciones terapéuticas de la terapia celular	95
1.6.9.1. – Generalidades	95
1.6.9.2.- Los casos indicados de la terapia celular	95
1.6.9.3. El uso de células mamíferas en la terapia celular	96
1.6.9.4.- Método de aplicación de terapia celular	97
1.6.9.5.- Estudios previos al tratamiento (en algunos casos)	98
1.7. - Cultivo celular	99
1.7.1.- Introducción histórica	99
1.7.2.- Evolución de los cultivos celulares hacia la terapia celular	101
1.7.3.- Conceptos actuales de cultivo celular	101
1.7.3.1.- Algunos conceptos de cultivo celular	102
1.7.3.2.-Algunas áreas de investigación dependientes de las técnicas de cultivo celular	103
1.7.4.- Biología del cultivo celular	103
1.7.4.1.- Tipos de cultivo celular	104

1.7.4.1.1.- Cultivos en monocapa	105
1.7.4.1.2.- Cultivos en suspensión	106
1.7.4.1.3.- Cultivos primarios	106
1.7.4.1.4.- Líneas celulares	106
1.7.4.1.5.- Cultivos tridimensionales	107
1.7.4.1.6.- Ventajas del cultivo celular	108
1.7.4.1.7.- Desventajas del cultivo celular	109
1.7.4.1.8.- Usos de los cultivos celulares	110
1.7.5.- Condiciones fisiológicas del cultivo celular	110
1.7.5.1.- Antibióticos y antifúngicos	111
1.8.- Ensayo científico: Vacuna contra la leucemia	111
 CAPITULO 2	 113
2.1.- Planteamiento del problema	113
2.2.- Justificación	113
2.3.- Preguntas de investigación	114
2.4.-Hipótesis de Investigación	114
2.5.- Objetivo General	114
2.6.- Objetivos Específicos	114
2.7.- Materiales y métodos	115
2.7.1.- Materiales	115
2.7.2.- Tampones, medios y soluciones	116
2.7.3. - Métodos de cultivo celular	116
2.7.3.1.- Cultivos celulares de K562	116

	VIII
2.7.3.2- Cultivo celular de CD3(+)	116
2.7.3.3.- <i>Cultivo celular de CD56(+)</i>	116
2.7.4.- Congelación de las células	116
2.7.5.- Lavado de las células	117
2.7.6.- Procedimiento de obtención de células mononucleares	117
2.7.7.- Procedimiento de cultivo celular en genera	117
2.7.8.- Cuenta celular total	118
2.7.9.- Separación de células CD3+ y CD56+ a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	119
2.7.9.1.- Separación de CD3(+)/CD56(+)	119
2.7.10.- Cultivos in vitro	120
2.7.10.1.- Obtención de muestra	120
2.7.10.2.- Procedimiento	120
2.7.10.3.- Conteo de células en la cámara de Neubauer	121
2.7.10.4.- Análisis de viabilidad	121
2.7.11.- Realización de las curvas de crecimiento celular	122
2.7.11.1.- Curva de crecimiento celular de K562	122
2.7.11.2.- Curva de crecimiento celular de CD3(+)	122
2.7.11.3.- Curva de crecimiento celular de CD56(+)	122
2.7.12.- Análisis de absorbancia de CD3(+), CD56(+) y K562	122
2.7.13.- Evaluación del efecto citotóxico (absorbancia) de células CD3(+) CD56(+) en células K562.	123
2.7.14.- Efecto apoptótico de las células CD3(+) CD56(+) sobre las células k562	123
3.- Resultados	124
3.1.- Obtención de células mononuclear	124

3.2.- Análisis de absorbancia de CD3(+), CD56(+) y K562	124
3.3.- Efecto de citotoxicidad y citolítica de CD3(+) y CD56(+) sobre k562 con aumento celular de 150 y 300 por microlitro	124
3.4.- Evaluación del efecto citotóxico (absorbancia) de células CD3(+) CD56(+) en células k562.	125
3.5.- Efecto apoptótico de las células CD3(+) y CD56(+) sobre las células K562	126
4.- Discusión	129
5.- Conclusión	133
6.- Bibliografía	134
ANEXO I Ensayo científico: vacuna contra la leucemia	162

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Fases mitóticas de la división celular.	16
Figura 2.- La división celular y de sus fases.	18
Figura 3.- Cinasa dependiente de ciclina (Cdk).	20
Figura 4.- Regulación intracelular.	20
Figura 5.- Las p21, p27 y p53.	21
Figura 6.- Ubiquitinaproteasoma.	21
Figura 7.- Punto de restricción.	22
Figura 8.- Punto de control 1.	23
Figura 9.- Puntos de control 2.	24
Figura 10.- Fase sin punto de control.	25
Figura 11.- Separación de las cromátides hermanas.	26
Figura 12.- Activación e inactivación de las procaspase.	28
Figura 13.- Activación de la apoptosis desde el interior de la célula	29
Figura 14.- Regulación de la apoptosis por la familia Bol-2.	32
Figura 15.- Factores que regulan la ruta de las células T activadas, después del reencuentro con el Aq.	34
Figura 16.- Propiedades de auto-renovación y potencialidad de los diferentes tipos de células madre	41
Figura 17.- Tipos de células madre según su origen	43
Figura 18.- Fases de un ensayo de terapia de sustitución celular en modelos experimentales	50
Figura 19.- Representación esquemática de varios puntos de ruptura en los genes ABL y BCR, y proteínas codificadas en leucemias BCR-ABL positivos	61
Figura 20.- Extensión de sangre periférica de un paciente con LMC, en fase crónica	63

	XI
Figura 21.- Morfología de K562	69
Figura 22.- Morfología de CD3	72
Figura 23.- Morfología de CD56	73
Figura 24.- Puntos de interés en el cultivo de tejidos y células	102
Figura 25.- Tipo de cultivo celular	105
Figura 26.- Clases de cultivos	107
Figura 27.- Factores que inducen muerte celular en gran escala de cultivos animales	109
Figura 28: Una cámara del hemocitómetro (Neubauer)	118
Figura 29: Diagrama de conteo celular	119
Figura 30: Efecto apoptótico de CD3+CD56+ sobre K562	125

INDICE DE GRÁFICA

Gráfica 1: Absorbancia entre 430 nm y 630 nm	125
Gráfica 2: Efecto apoptótico de las células CD3(+)CD56(+) sobre las células K562	126
Gráfica 3: Curva de crecimiento celular de K562	127
Grafica 4: Curva de crecimiento celular de CD(3+)	127
Gráfica 5: Curva de crecimiento celular de CD(56+)	128
Grafica 6: Curva de crecimiento celular de CD(3+)CD(56+)	128

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Número y concentración de células por pozo

70

Tabla 2: Absorbancia de CD3(+), CD56(+) y K562

124

ABREVIACIONES

ABL	Abelson (gen protooncogén ABL)
ADA	Adenosina diaminasa
ADN	Acido desoxiribonucleico
ADP	Adenosín bifosfato
Ag	Antígeno
APC	Complejo promotor de la anafase
ASBMT	Sociedad Americana para el Transplante de la Medula Ósea
ATG	Gobulina antitímocito
ATP	Adenosín trifosfato
BSS	Soluciones salinas equilibradas
Bcl-2	B cell leukemia/lymphoma 2 genes
BCR	Receptor específico del Ag de las células B Breakpoint cluster region (gen BCR)
BCR-ABL	Gen quimérico de fusión BCR-ABL
BME	Medio Basal de Eagle
CAM	Glicoproteína con 689 aminoácidos
CD	<i>Cluster de diferenciación (grupo de diferenciación)</i>
CD3(+)	Cluster de diferenciación 3 positiva
D56(+)	Cluster de diferenciación 5 positiva
CD8+	Cluster de diferenciación 8 positiva
Cdc	Ciclo de división celular
Cdk	Cinasa dependiente de ciclina
Ced-3	ICE-enzima convertidora de IL1 b
CIP	proteínas inhibidoras de cdk's
CKI	Conjuntos inhibidores de cdk (INK4 y CIP)
CIK	Células asesinas inducidas por citoquinas
CMH-cu	Células madre hematopoyéticas- cordon umbilical
CMH- mo	Células madre hematopoyéticas- medula ósea
CMH	Células madre hematopoyéticas
CMM	Células madre mesenquimatosas
CMRB	Centro de Medicina Regenerativa de Barcelo
CMV	Citomegalovirus
CO₂	Dióxido de carbono
CTL	Linfocitos T citotóxicos específicos
CU	Cordón umbilical
DLI	Infusiones de leucocitos de donante
DMEM	Medio MEM modificado por Dulbeco
DNAsa I	Desoxirribonucleasa 1
EBV	Virus de Epstein-Barr
ECC	Células madre embrionarias de carcinoma
EGC	Células madre embrionarias germinales
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ESC o CME	Células madre embrionarias
FACT	Fundación de la Acreditación de Terapia Celular
Fas o Apo-1	Cluster de diferenciación 95 (CD95)
FAK	Cinasa de adhesión focal
FC	Fase crónica
FCS	Suero fetal bovino
G-CSF	Factor de crecimiento de colonias de granulocitos
G₀	Gap cero o grout cero
G₁	Gap uno o grout uno
G₂	Gap dos o grout dos
GVHD	Enfermedad del injerto contra el huésped
GVL	Leucemia <i>versus</i> injerto
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
IBMTR	International Bone Marrow Transplant Registry
IFNα	Interferón alfa
IFN-gamma	Interferón-gamma
IL-2	Interleukin-2
IMDM	Modificación de Iscove del medio DMEM
INK4	inhibidoras de cinasa 4
ISCT	Sociedad Internacional de Terapia Celular
ITAM	Tirosina immunoreceptor motivo basado en la activación
JAK-STAT	Janus activated kinase–signal transducer and activator of transcription
K562	Eritroleucemia humana
KDa	Kilo daltones
LCP	Leucemia de células pilosas (Reticuloendoteliosis leucémica)
LIF	Factor inhibidor de la leucemia
LLA	Leucemia linfocítica aguda
LLC	Leucemia linfocítica crónica
LMA	La leucemia mieloide aguda
LMC	La leucemia mieloide crónica
LOM-2	Locus del gen
MAPK	Cinasas activadas por mitógenos
M-BCR	Puntos de ruptura, en el gen BCR
M-bcr/abl	Major Breakpoint Cluster Region
m-bcr (minor)	Minor Breakpoint Cluster Region
μ-bcr (micro)	Micro Breakpoint Cluster Region
MDR	Enfermedad mínima residual
M/E	Microscopio electrónico
MEF	Fibroblastos embrionarios murinos
MEM	Medio Mínimo Esencial de Eagle
MO	Medula ósea
MoAb OKT3	Anticuerpo monoclonal
MPF	Factor Promotor de la Mitosis
MSC	Células madre mesenquimales
NATF	América del Norte Grupo de Tareas
N Apase	Enzima derivada de linfocitos y en enfermedades linfoides

NCAM	Molécula de adhesión neural
NGF	Receptor del factor de crecimiento neuronal
NK	Células asesinas
NKH1	Leu-19,
NMSCT	Transplantes no mieloablativos de células madre
NSC	Células madre neurales
PBMNCs	Células mononucleares de la sangre periférica
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PMN	Polimorfonucleares
Pre-RC	Complejo de prereplicación
PR1	Proteinasa derivada de péptido
p21, p27 y p53	Factores de transcripción
Proteína Rb	Proteína del Retinoblastoma
Ph	Cromosoma Filadelfia
RA	Ácido retinoico
RNA	Acido ribonucleico
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute
S	Superficie
S	Síntesis del ciclo celular
SC	Células madre
SCID	Inmunodeficiencia Combinada Grave
SCT	Transplante de células madre
SCU	Sangre del cordón umbilical
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
SNC	Sistema nervioso central
STI 571	Inhibidor de la tirosina quinasa
TC	Terapia Celular
TCR	Receptor de células T
(TCRα y TCRβ)	Receptor de células alfa y beta
TNF	Factores de Necrosis Tumoral
V	Volumen
ZAP70	Zeta proteína asociada

INTRODUCCIÓN.

El progreso científico en los campos de la biología, la biotecnología, ingeniería biomédica y la medicina ha dado alas al desarrollo de prometedores enfoques para la prevención y el tratamiento, genéticos o celulares, de enfermedades cancerosas y en especial, la leucemia.

La sangre humana es el tejido fluido más complejo observado hasta ahora en todo el Universo. Hay tantas células en la sangre humana como estrellas en nuestra galaxia. Con sus centenares de billones de células, este tejido de tan sólo 7% de peso corporal, ha permitido a los seres humanos erigirse como la especie dominante del planeta. Pero, ¿cómo funciona la sangre? ¿Cómo se forma toda esta complejidad? ¿Cómo se puede reparar cuando se daña?

¿Cómo se podrá reparar las células dañadas debido a una enfermedad o a un accidente? Hoy en día no se dispone de tratamientos realmente eficaces para enfermedades hematológicas como las leucemias: mielocítica aguda, mielocítica crónica, linfocítica aguda, linfocítica crónica, leucemia de células pilosas, etc.

La sociedad en su conjunto está muy afectada y las enfermedades cancerosas son cada vez más comunes. En algunos casos existen tratamientos para paliar los síntomas, pero nunca se ha podido detener eficazmente el proceso proliferativo de las células cancerosas que provoca la muerte progresiva de muchas personas.

La actual investigación en el campo de las células madre está abriendo nuevas posibilidades con las que luchar contra estas enfermedades. La revolución que está protagonizando en el ámbito científico ha entrado de lleno en el debate social, político y filosófico y promete trasladarse, en el futuro, al ámbito médico. En los últimos años se está llevando a cabo una intensa investigación sobre las propiedades biológicas a nivel celular y molecular de estas células y sobre sus posibles aplicaciones terapéuticas. Las células madre encierran supuestamente un enorme potencial de reparación. Con los conocimientos adecuados que permitan su manipulación de forma segura y controlada, se podrá en un futuro no muy lejano, disponer de revolucionarias terapias como la terapia celular para muchas enfermedades hoy en día incurables, entre ellas, las leucemias.

La leucemia es una enfermedad caracterizada por una detención en la maduración de las células encargadas de la formación de los constituyentes de la sangre, con una proliferación y crecimiento descontrolado de células sanguíneas inmaduras. Esta proliferación se origina a nivel de la médula ósea, a partir de la cual se disemina a la sangre y los distintos tejidos (Ersvaer et al., 2007).

La leucemia es una enfermedad maligna que afecta a los tejidos encargados de formar sangre. Ataca principalmente a la médula ósea, los ganglios linfáticos y al bazo. En presencia de la leucemia, los tejidos que forman la sangre llenan al torrente sanguíneo y al sistema linfático de glóbulos blancos atípicos e inmaduros. Estas células inmaduras no pueden cumplir con su función de combatir infecciones. Además, reducen

la producción de glóbulos rojos normales que evitan la anemia y de pequeños discos llamados plaquetas que regulan la coagulación (Ersvaer et al., 2007).

El cáncer de leucemia es un complejo y heterogéneo estado patológico en el que las células proliferan sin control. Es un proceso microevolucionario, que se produce en una escala temporal de meses o años y se postula que su origen, es monoclonal. Es una enfermedad en la que las células individuales comienzan a prosperar en forma egoísta a expensas de sus vecinas, y que finalmente destruyen toda la sociedad celular y mueren (Chen et al., 2007).

La leucemia se divide en dos grandes categorías: aguda y crónica. La leucemia aguda produce una acumulación de glóbulos blancos inmaduros. Se desarrolla rápidamente y es la más común en los niños y adultos jóvenes. La crónica es más frecuente en edades medias y en los adultos y su desarrollo es lento, generalmente durante muchos años. En la leucemia crónica, los glóbulos blancos son más maduros. Asimismo, se identifica a la leucemia por el tipo de glóbulo blanco al que ataca. La leucemia linfocítica o linfoblástica afecta a los glóbulos blancos que se forman en los ganglios linfáticos y bazo, mientras que la leucemia mielocítica (también llamada granulocítica o mielógena) afecta a las células que se forman en la médula ósea.

Las leucemias pueden clasificarse según la célula sanguínea o la línea celular predominante en la sangre periférica. De este modo, en la leucemia mielocítica existe un predominio de mielocitos, en la leucemia linfocítica, abundan los linfocitos inmaduros, y en la leucemia monocítica, los monocitos inmaduros.

La mayoría de las leucemias no tienen causa conocida. La exposición a radiaciones ionizantes y ciertos productos químicos como el benceno son algunos de los factores que pueden producir la enfermedad. Se sabe que la leucemia humana de células T es provocada por dos virus, y algunas leucemias se han relacionado con ciertas alteraciones cromosómicas (Jo de Mejia y Lila, 2006).

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia que afecta principalmente a la población adulta, su incidencia a nivel mundial es de uno a dos casos por cada 100 mil individuos (Fader et al., 1999).

En México, según Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, la tasa de mortalidad por esta enfermedad es de tres por cada 100 mil habitantes. Se caracteriza por presentar leucocitosis y esplenomegalia. Esta neoplasia presenta diferentes fases:

Fase crónica: es el inicio de la enfermedad y mediante técnicas citogenéticas convencionales aproximadamente 90% de los casos presenta el cromosoma Filadelfia (Ph), el cual es el resultado de una translocación entre los cromosomas 9 y 22, originándose diferentes rearrreglos moleculares como consecuencia de los diversos rompimientos en ambos cromosomas, de los cuales en 98% de los casos dan origen al gen quimérico M-bcr/abl. Mediante citogenética convencional, 10% de los casos no presentan el cromosoma Ph, sin embargo, mediante técnicas moleculares aproximadamente 50% de ellos lo presentan (Aurich et al., 1998).

Fase acelerada: con el progreso de la enfermedad el paciente puede o no pasar a una fase de aceleración mieloproliferativa, antes de pasar a una fase de crisis blástica.

Crisis blástica: en esta fase de la enfermedad, 60 a 80% de los casos presentan otras alteraciones cromosómicas no al azar, extras al cromosoma Ph también llamadas alteraciones secundarias (Heim y Mitelman, 1995).

Dichas alteraciones cromosómicas se han clasificado en ruta mayor y ruta menor de acuerdo a su frecuencia (Mitelman et al., 1976).

En base a todos los casos reportados en la literatura mundial (más de 1600), se sugiere que las alteraciones cromosómicas de la ruta mayor incluyan aquellas cuya frecuencia sea mayor o igual a 5%, las cuales son: +8, +Ph, i(17q), +19, -Y, +21 y -

7.6.7. Dado lo anterior, el paciente con LMC puede presentar o estar precedido por un perfil citogenético asociado con una determinada fase de la enfermedad, lo cual ha dado paso a una investigación intensa a nivel molecular (Mitelman et al., 2002). En datos recientes se ha encontrado que la presencia de dichas alteraciones secundarias varían significativamente de acuerdo al tratamiento recibido durante la etapa crónica (Johansson et al., 2002).

El primer artículo publicado que describe un caso de leucemia en la literatura médica data de 1827, cuando un médico francés llamado Alfred-Armand-Louis-Marie Velpeau describió el caso de una florista de 63 años de edad con una enfermedad cuyos principales síntomas eran fiebre, debilidad, cálculos renales y hepatosplenomegalia. Velpeau advirtió que la sangre de esta paciente tenía una consistencia semejante a la "papilla de avena" e hipotetizó que este aspecto de la sangre era debido a los glóbulos blancos (de Vries et al 2006).

Bennett (1845) reportó una serie de casos similares de pacientes que fallecieron con esplenomegalia y cambios "en el color y la consistencia de la sangre". Bennett utilizó el término "leucocitemia" para describir esta condición patológica (de Vries et al., 2006).

El término "*leucemia*" fue acuñado por Rudolf Virchow (1856), el renombrado patólogo alemán. Pionero en el uso del microscopio óptico en el campo de la patología, Virchow (1856) fue el primero en describir el anormal exceso de glóbulos blancos en pacientes con el síndrome clínico descrito por Velpeau. Virchow no estaba seguro de la causa que producía el exceso de glóbulos blancos, por lo que decidió utilizar el término puramente descriptivo de "leucemia" (del griego *sangre blanca*), para darle nombre a esta patología (Mandelli et al., 2002).

Los avances en la comprensión de la LMA progresaban con el desarrollo de las nuevas tecnologías. Paul Ehrlich (1877) desarrolló una serie de técnicas de tinción de células sanguíneas que le permitieron describir en detalle y diferenciar los glóbulos blancos normales y anormales. Wilhelm Ebstein (1889) introdujo el término "*leucemia aguda*" para diferenciar las leucemias progresivas de las leucemias crónicas (Gupta et al., 2002). El término "*mieloide*" fue acuñado por Neumann en 1869, tras ser el primero en determinar que los glóbulos blancos provenían de la médula ósea (del griego *μυελός*, *myelos* = médula) y no del bazo (Gupta et al., 2002).

Fue Mosler (1879) quien, diez años más tarde, describía por primera vez una técnica para examinar la médula ósea y diagnosticar la leucemia (Gupta et al., 2002). Finalmente, Naegli (1900) caracterizó los mieloblastos, que pertenecen a la estirpe celular afectada en la LMA, y dividió los tipos de leucemia en mieloides y linfoides, según la estirpe celular sanguínea que se viera afectada (Gupta et al., 2002).

Los modelos animales de cáncer han sido utilizados desde hace muchos años en distintas áreas de la investigación. Sin embargo, en los últimos años y debido sobre todo al enorme avance en los conocimientos sobre las bases moleculares del cáncer, ha surgido la necesidad de disponer de modelos genéticamente definidos, es decir, donde las mutaciones genéticas que predisponen o participan en el desarrollo de la enfermedad pueden ser controladas (Mandelli et al., 2002).

Los procesos celulares de interés en cáncer incluyen las señales mitogénicas como factores de crecimiento y sus receptores, vías de transducción de señales, regulación de los complejos de transcripción, control del ciclo celular, procesos de apoptosis, comunicación entre células, adhesión y motilidad celular, etc. (Ocaña et al., 2007).

Esta necesidad, combinada con el vertiginoso avance en tecnología para la manipulación genética en mamíferos y sobre todo en ratón ha conducido al desarrollo de modelos animales modificados genéticamente, en su mayoría de origen murino, cada

vez más sofisticados, que recapitulan muchos de los procesos que tienen lugar en la patología del cáncer en humanos. Estos modelos están proporcionando una visión más adecuada del proceso tumoral y permiten obtener mejores modelos experimentales para desarrollar y ensayar nuevas terapias (Mandelli et al., 2002).

La utilización de este tipo de modelos experimentales es esencial para el entendimiento de la función *in vivo* de genes implicados en el desarrollo tumoral, como oncogenes o genes supresores de tumores, así como los genes modificadores, u otras moléculas involucradas en los diferentes procesos celulares como el control de la proliferación celular. La era de la genómica ha puesto de manifiesto muchas rutas moleculares diferentes que están implicadas en carcinogénesis (Paterson et al., 2006).

La expansión de cromosoma de Filadelfia negativa, CD3(+)CD56(+) células citotóxicas en 13 pacientes con LMC *in vitro* y la eficacia *in vivo* en inmunodeficiencia combinada severa ha sido estudiado por Hoyle et al., 1998. Desarrollaron las condiciones de cultivo para la expansión eficiente de las células efectoras citotóxicas de las células mononucleares de la sangre periférica (PBMNCs) por el tiempo adicionado de interferón-gamma (IFN-gamma), interleukin-2 (IL-2), y el anticuerpo monoclonal (MoAb) OKT3. Reportaron que estas células llamadas células asesinas (NK) inducidas por citoquinas (CIK), son compuestas principalmente de células T, y la población de células con actividad citotóxica mayor es de otro modo una población rara de CD3(+)CD56(+) células que expanden dramáticamente bajo las condiciones de cultivo. Los cultivos contenían un número variable de células T al inicio del cultivo (mediano 44%, rango 1% a 64%), aun después de 21 a 28 días de cultivo, virtualmente todas estas células fueron CD3(+) células T (mediano 97%, rango 90% a 99%). Los subtipos CD3(+)CD56(+) de células expandieron significativamente (mediano 25-pliegue, rango 2.2 a 525-pliegue). Las células CIK de todos los pacientes demostraron actividad citotóxica contra las líneas celulares OCI-LY8 y K562 (Shamblott et al., 1998).

Además, Hongeng et al., 2003, estudiaron un cierto número de pacientes pediátricos que resistían a los tratamientos convencionales de sus malignidades. Uno de los mecanismos de recaída es escape de la inmunidad (Reubinoff et al., 2000; Wurmser y Gage, 2002). Según ellos la inmunoterapia adoptiva celular con células efectoras tiene la potencia para combatir este escape. En los adultos las células CD3+CD56+, una célula asesina inducida por citoquina (CIK), aparece ser un tipo celular efector prometedor con mayor citotoxicidad. Este tipo celular efector puede funcionar en los niños también.

El efecto de un injerto contra leucemia ha sido documentado para prevenir recaída en LMC después de trasplante ósea alogéneo. Un tipo de linfocitos que puede contribuir a este efecto son las células asesinas naturales (NK), que después de activación con interleukin (IL)-2, exhibe un rango amplio de actividad citotóxica contra células alogéneas y autólogas (Cervantes et al., 1996). Los mismos autores han demostrado que la IL-2-activada NK (ANK) puede ser generada de la sangre de los pacientes con LMC y son de origen benigno. Sin embargo, su función y proliferación disminuyen con el desarrollo de la enfermedad de LMC, sugiriendo un papel de vigilancia tumoral.

Los estudios recientes indican que los pacientes con LMC tienen una población de células citotóxicas benignas en su sangre periférica que pueden expandir y activar *in vitro* en la presencia de interleukin-2 (IL-2) dando lugar a las células citolíticas activadas por linfoquina o LAK (células asesinas activadas por linfoquinas) (Cervantes et al., 1995).

De acuerdo a los antecedentes anteriores, ninguno han trabajado sobre Terapia Celular empleando células CD3(+)CD56(+) en un modelo celular experimental con

leucemia inducida con células K562. Estudiar la capacidad citotóxica y citolítica de CD3(+) y CD56(+) respectivamente contra las células leucémicas en modelo celular experimental inducidas por las líneas celulares K562 y estudiar el efecto apoptótico de CD3(+)CD56(+).

1.- CELULAS

1.1.- DEFINICION Y PROPIEDADES GENERALES.

Hasta el final del siglo XIX no se elaboró la teoría celular, que enuncia que la célula es la unidad morfológica, fisiológica y genética de todos los seres vivos, y que además toda célula proviene de otra. Todas las células tienen una estructura común: la membrana plasmática, el citoplasma y el material genético o ADN. Se distinguen dos clases de células: las células procariotas (sin núcleo) y las células eucariotas, mucho más evolucionadas y que presentan núcleo, citoesqueleto en el citoplasma y orgánulos membranosos con funciones diferenciadas (Alberts et al., 2002).

La palabra célula se empezó a usar hace unos tres siglos, cuando Robert Hooke (1665), valiéndose de un microscopio construido por él mismo, notó que el corcho (médula de un árbol denominado saúco) estaba formado por pequeñas cavidades a las que llamó "células" (lo que significa pequeñas celdas). Hoy en día, mediante la utilización de microscopios especiales, como el microscopio electrónico, se puede ver dentro de cada célula, "espíar" su interior y entender su funcionamiento (Peña, 1986).

Todos los organismos vivos están formados por células, y en general se acepta que ningún organismo es un ser vivo si no consta al menos de una célula. El organismo humano, por ejemplo, está formado por unos 200.000 millones, presentando diversas formas y funciones, cuya finalidad común es la supervivencia y la reproducción (Peña y Dreyfus, 1990).

Se puede hacer una primera clasificación de las células, se denomina eucariontes a aquellas células que tienen núcleo y procariotas a las que carecen de él. Las células procariotas por su nombre significan antes del núcleo. Son organismos muy primitivos que consisten en células únicas, cuando el material genético se encuentra libre en el citoplasma sin ninguna membrana que lo aisle el núcleo celular. No están diferenciadas en núcleo y citoplasma. Este tipo de células están representadas principalmente por un determinado tipo de algas microscópicas (algas verdes y azules ó Cianófitas) y por las bacterias, pertenecen al grupo de las Moneras. El ADN de las células procariotas está confinado a una o más regiones nucleares, que se denominan nucleoides, que se encuentran rodeados por citoplasma, pero carecen de membrana. En las bacterias, el nucleóide esta formado por un pedazo de ADN circular de aproximadamente 1 mm de largo, torcido en espiral, que constituye el material genético esencial. Estas células son las más primitivas de nuestro planeta, hicieron su aparición en los océanos hace aproximadamente 4 mil millones de años. El resto fósil de los organismos procariotas de esta época forma columnas fosilizadas de aproximadamente 10 metros de alto llamados estromatolitos, se los suele hallar en Australia (Cooper y Hausman, 2005).

Las cianófitas, algas verde-azules, son generalmente más grandes que las células bacterianas, realizan la fotosíntesis mediante vías metabólicas comunes a las plantas y algas, pero no a las bacterias. Un gran número de células procarióticas, están rodeadas por paredes celulares, que carecen de celulosa, lo que las hace diferentes de las paredes celulares de las plantas superiores. En la parte interna de la pared celular, se encuentra

la membrana plasmática o plasmalema, la cual puede ser lisa o puede tener invaginaciones, llamados mesosomas, donde se llevan a cabo las reacciones de transformación de energía (fotosíntesis y respiración). En el citoplasma, se encuentran los ribosomas, donde se realiza la síntesis de proteínas. Así mismo, el citoplasma de las células procarióticas más complejas puede contener también vacuolas, vesículas (pequeñas vacuolas) y depósitos de reserva de azúcares complejos o materiales inorgánicos. En algunas algas verde-azules las vacuolas están llenas con nitrógeno gaseoso (Lodish et al., 2004).

Las células eucariotas por su nombre significan verdadero núcleo. A este conjunto pertenecen las células animales y vegetales, donde está bien diferenciado el núcleo del citoplasma. El hombre posee células eucariotas donde el material genético está aislado por un sistema de membranas formando el núcleo celular.

Las células son tan pequeñas que no se puede medir ni siquiera con los milímetros de la regla. Se necesitan medidas muy pequeñas. Si se corta un metro en un millón de partes iguales se obtendrá al *micrón* y se utiliza una letra griega (μ) m para representar esta unidad. Una restricción importante del tamaño celular la impone la relación entre el volumen y su superficie (Lodish et al., 2004).

Los materiales que entran y salen de la célula deben atravesar su superficie, cuanto más intenso sea su metabolismo, cantidad de actividades que realice, con mayor velocidad debe intercambiarse estos materiales con el ambiente donde se encuentre. La velocidad de intercambio depende de la superficie que se tenga para hacer ese intercambio. Una segunda limitación del tamaño celular se relaciona con la capacidad del núcleo, centro de control de la célula, para proporcionar suficientes copias de información necesaria para regular los procesos que tienen lugar en el citoplasma de una célula. Por este motivo, la mayoría de las células metabólicamente activas (gran cantidad de procesos químicos y físicos en su interior) son pequeñas. Hay células de formas y tamaños muy variados. Algunas de las células bacterianas más pequeñas tienen forma cilíndrica de menos de un micrón (μ) de longitud. Las células de los tejidos animales suelen ser compactas, de 10 a 20 μ de diámetro (Peña, 1983).

Cuando una célula aumenta de tamaño, aumenta mucho más su volumen (V) que su superficie (S) (debido a que $V = 4/3\pi r^3$ mientras que $S = 4\pi r^2$). Esto implica que la relación superficie/volumen disminuye, lo que es un gran inconveniente para la célula ya que la entrada de nutrientes está en función de su superficie y no del volumen. Por este motivo, la mayoría de las células maduras son aplanadas, prismáticas e irregulares, y pocas son esféricas, de forma que así mantienen la relación superficie/volumen constante. El aumento de volumen de la célula nunca va acompañado del aumento de volumen del núcleo, ni de su dotación cromosómica (Cooper y Hausman, 2005).

Los organismos pueden ser unicelulares y pluricelulares. Los unicelulares constituyen los microorganismos, como por ejemplo, las bacterias; y los pluricelulares, por el contrario, están constituidos por varios tipos celulares, cada uno de los cuales realiza determinadas funciones especializadas. Todas las células eucariotas, independientemente de la función que realicen tienen en común: la presencia de una membrana plasmática que delimita el contenido celular del medio que la rodea, una endomatrix fluida (citósol) compuesta por una solución de proteínas, electrolitos y carbohidratos, en la que está presente un sistema de endomembranas que delimitan: compartimentos (organelos) en los cuales se desarrolla el metabolismo celular y sus productos (inclusiones) y el mayor de los compartimentos, el núcleo que constituye por su contenido en ADN, el centro rector de la actividad metabólica celular y la presencia en la matriz citoplasmática de estructuras proteicas filamentosas (microtúbulos,

microfilamentos y filamentos intermedios), que constituyen el citoesqueleto (Cooper y Hausman, 2005).

La matriz citoplasmática con los componentes del citoesqueleto, los organelos, las inclusiones y el citosol, constituyen el citoplasma que se observa en las células con la coloración de Hematoxilina-Eosina. En el citoplasma, se produce, almacena y libera energía; se sintetizan proteínas, lípidos y polisacáridos y se llevan a cabo otras múltiples funciones. Su organización, renovación y generación depende de la información contenida en el núcleo. El volumen del citoplasma es proporcional al del núcleo. La relación núcleo- citoplasma, varía de un tipo celular a otro; en la mayoría de las células el citoplasma excede en tres a cinco veces el volumen nuclear (Lodish et al., 2004).

1.1.1.- COMPARTIMENTACIÓN CELULAR.

El concepto compartimentación define el hecho de que existan distintos espacios celulares, limitados por una membrana, que realicen distintas funciones, lo cual crea en la célula una división del trabajo: por ejemplo, en las mitocondrias se efectúa la respiración; en los lisosomas, la digestión celular; en el retículo endoplasmático, la síntesis de diversas sustancias; etc. Es por esto que se puede hablar de organelos membranosos y organelos no membranosos. A partir de la utilización del microscopio electrónico, cambió totalmente la imagen estructural que se tenía de la célula. Esto se debió a que en el hialoplasma, aceptado hasta entonces como un complejo coloidal, se observaron un conjunto de estructuras, algunas rodeadas de membrana, y otras no, que condujeron a la clasificación que actualmente se tiene de los organelos. Los organelos membranosos son: retículo endoplasmático liso y rugoso, aparato de Golgi, mitocondrias, lisosomas y peroxisomas. Los organelos que no poseen membranosos incluyen: ribosomas y centriolos. El límite de la célula está determinado por la membrana plasmática. Los organelos son: retículo endoplasmático, aparato de Golgi, mitocondrias, ribosomas, lisosomas, peroxisomas y centriolos. Las inclusiones son lípidos, glucógeno, caroteno, melanina y otros (Alberts et al., 2002).

A fines del siglo pasado, a partir de estudios bioquímicos y de permeabilidad, se determinó la existencia en todas las células de una estructura de naturaleza lipoproteica, no visible al microscopio óptico, y que se denominó membrana plasmática o plasmalema. Con el desarrollo de las técnicas de microscopía electrónica, a partir de 1950, se aprecia la membrana citoplasmática, formada por tres láminas con un grosor de 7.5-10 nm. La estructura trilaminar formada por dos capas oscuras periféricas y una capa central clara, no solo se observaba en la membrana plasmática, sino que también fue observada en las membranas de todos los organelos membranosos. El concepto de unidad de membrana en la actualidad se ha reconsiderado debido a que la imagen observada al microscopio electrónico corresponde mas bien a un artefacto de la técnica empleada en la fijación, que a la estructura de las membranas celulares, así como, la composición química y la función de las membranas es diferente en las células y dentro de una misma célula (Peña, 1986).

En la composición química de la membrana plasmática están presentes lípidos, proteínas y carbohidratos. Las proporciones de estos tres elementos varían de un tipo celular a otro. Los lípidos, más abundantes en la membrana, son: fosfolípidos, triglicéridos, esteroides y glicolípidos, los cuales se organizan formando una bicapa que se corresponde con la línea central clara que se observa, al microscopio electrónico, en la estructura trilaminar de la membrana. Las proteínas, por su parte, son moléculas anfóteras que se encuentran formando una complicada estructura tridimensional. Su

disposición en la membrana es más compleja que la de los lípidos, y en la estructura trilaminar son responsables de las capas oscuras periféricas que en ellas se observan.

Los carbohidratos se localizan en la membrana unidos a los lípidos y a las proteínas formando glicolípidos y glicoproteínas. La presencia de los carbohidratos en la cara externa de la membrana le confiere cierta asimetría. Estos carbohidratos son la base de una estructura filamentosa que rodea a la cara externa de la membrana plasmática y que se denomina cubierta celular o glicocálix (Peña, 1986).

La estructura trilaminar tan relativamente sencilla que se observa de la membrana plasmática al microscopio electrónico, no explica las propiedades fisiológicas tan complejas que ella presenta; por lo que a partir de su observación al microscopio electrónico (M/E) han sido muchos los modelos moleculares hipotéticos que se han planteado para explicar la organización molecular de los compuestos constituyentes de la membrana. En estudios realizados en membranas de eritrocitos, se determinó que la cantidad de lípidos presentes en ella eran suficientes para que los lípidos se organizaran formando una bicapa. Singer (1970), con las técnicas de congelación-fractura y congelación-grabado, planteó un modelo que respondiera a los conocimientos que se tenían en la membrana. En esta técnica se fractura la membrana a nivel central, separando las dos zonas proteicas. Contrario a lo que se esperaba, en la zona de fractura se observaron unas estructuras globulosas que se hallaban encajadas en la membrana; posteriormente fueron identificadas como proteínas globulares. Esto hizo cambiar en cierto aspecto el concepto molecular que se tenía de la membrana en relación con las proteínas, y es así que Singer y Nicholson (1972), plantearon el modelo de Mosaico fluido (Cooper y Hausman, 2005).

El modelo plantea una matriz lipídica acuosa, y proteínas de tipo globular que se disponen de dos formas: en la periferia y en todo el espesor de la membrana. Los lípidos y las proteínas están dispuestos en una forma parecida a mosaicos permitiendo cierto movimiento de lateralización y rotación. Las primeras que atraviesan todo el espesor de la membrana, se denominan proteínas o integrales o extrínsecas, las otras se denominan proteínas periféricas o intrínsecas. Este modelo hace pensar en un mar de lípidos en el que están incluidos "témpanos" que son las proteínas. Muchas de las moléculas de proteínas integrales que atraviesan la bicapa lipídica, están unidas de manera directa o indirecta a microtúbulos y microfilamentos del citoplasma. La membrana plasmática presenta asimetría, que establece ciertas diferencias entre las superficies internas y externas. La distribución asimétrica significa la distribución desigual de los componentes moleculares que forman parte de la membrana, pudiéndose encontrar los mismos formando parte de la cara protoplasmática y en otros casos de la cara extracelular. Por ejemplo, los oligosacáridos unidos a glicoproteínas y glicolípidos forman parte de la cubierta celular o glicocálix, es decir, se limitan a la cara externa de la membrana. También, en la mitad de la superficie externa se localizan varias moléculas receptoras, las cuales se relacionan con elementos del medio externo de la célula (Lodish et al., 2004).

Por otra parte se ha determinado que el contenido de lípidos y proteínas de ambas caras de la membrana es diferente. También, se han observado microfilamentos y microtúbulos unidos a proteínas de la parte citoplasmática de la membrana y que, al parecer, controlan el movimiento de ellas. La membrana plasmática funciona como una barrera protectora que mantiene la integridad del protoplasma a la par que determina el transporte de sustancias entre el medio interno celular y el medio externo. La membrana es selectivamente permeable y muestra distintos mecanismos de transporte, los cuales van desde la simple difusión u osmosis, hasta procesos tan complejos como son la pinocitosis y fagocitosis. En la membrana se generan potenciales eléctricos que se

transmiten como una onda de excitación de un punto a otro de la célula. Por último, en la membrana hay moléculas que funcionan como receptores hormonales en el reconocimiento de determinadas hormonas hidrosolubles. Simultáneamente, la matriz citoplasmática o endomatriz está formada por: componentes para las funciones metabólicas, enzimas solubles, que son componentes proteicos que intervienen en la glucólisis anaeróbica, en la activación de los aminoácidos para la síntesis proteica y en general, en el metabolismo celular (como catalizadores biológicos), proteínas estructurales, en su mayoría de forma globular y de las cuales dependen la viscosidad celular, los movimientos internos y ameboides, la formación de microtúbulos y ácidos ribonucleicos, que intervienen directamente en la síntesis proteica (Cooper y Hausman, 2005).

1.1.2.- CITOESQUELETO.

El citoesqueleto, está constituido por microfilamentos, filamentos intermedios y microtúbulos que forman una red tridimensional de soporte al resto de las estructuras citoplasmáticas y que se fija a proteínas de la membrana. Mientras más caprichosa es la forma celular, más desarrollo es necesario en este andamiaje proteico, ya que contribuye a la arquitectura celular, la fijación de los organelos y a sus movimientos a través del citosol. También facilita los movimientos celulares y el mantenimiento de las uniones celulares. Actualmente se conocen tres categorías de filamentos. En la primera categoría, se incluyen los microfilamentos que presentan entre 5-6 nm de diámetro y que están compuestos por la proteína actina. Esta proteína fue identificada primeramente con los músculos, actualmente se ha comprobado que está presente en muchos otros tipos celulares. Estos filamentos se localizan por debajo de la membrana plasmática y forman, junto con otros tipos de filamentos, el velo terminal. Asociados con estos filamentos, se pueden apreciar también otras proteínas: troponina, tropomiosina y α -actina. La segunda categoría de filamento incluye los filamentos de miosina, que al igual que la actina se observó primero en las células musculares. Son filamentos más gruesos que los filamentos de actina y pueden llegar a medir hasta 10 nm de diámetro. Al igual que en el músculo forma complejos con la actina e interviene en los movimientos celulares. El mecanismo de contracción de filamentos se realiza por la actina y miosina. Sistemas contráctiles no musculares se han demostrado en muchos animales, por ejemplo, en las células del epitelio intestinal se ha comprobado la presencia de actina en las microvellosidades que se conectan a los microfilamentos y a las proteínas de la membrana. La tercera categoría de filamentos incluye los filamentos intermedios; estos tienen entre 7-10 nm de diámetro y se relacionan con el mantenimiento de la forma celular, constituyendo una malla a través del citoplasma (Peña, 1983).

Los tipos de filamentos intermedios son: filamentos de citoqueratina, neurofilamentos, filamentos de vimentina, filamentos de desmina, filamentos gliales y filamentos heterogéneos. En el núcleo, se unen a la superficie interna de la membrana interna de la envoltura nuclear y se denominan lámina nuclear. Los microtúbulos se encuentran en casi todas las células del organismo. Son estructuras alargadas de un diámetro de unos 25 nm y de longitud variable y que tienden a ser rectos, lo que implica que tienen cierta rigidez, aunque son lo suficientemente flexibles para que se doblen sin romperse. Los microtúbulos ayudan a la conservación de la forma celular, facilitan el flujo de diversas partículas y sustancias a lo largo de las células, siendo características en la célula nerviosa, la cual presenta en sus prolongaciones los llamados neurotúbulos,

que son en realidad microtúbulos. Otra función fundamental de los microtúbulos es en el movimiento y la formación del huso mitótico (Lodish et al., 2004).

1.1.3.- CENTRIOLOS.

Los centriolos, no tienen membrana. Casi siempre se presentan en pares y se hacen visibles cuando la célula entra en división, en una posición perpendicular entre ambos. Son dos cuerpos pequeños que se encuentran cerca del núcleo de las células, y tienen la capacidad de duplicarse antes de que se inicie la división celular. De estructura tubular y hueca, sus paredes están constituidas por microtúbulos, de los que emerge el aparato miótico necesario para la división celular. Los centriolos son dos estructuras cilíndricas, formadas por microtúbulos, que se encuentran constituyendo el centrosoma o región perinuclear. Los centriolos miden 0,5 μm de longitud por 0,25 μm de diámetro, y presentan un extremo ocluido y otro abierto. Cada par de centriolos están orientados perpendicularmente. Las células presentan uno o dos centrosomas, pero hay células poliploides (células hepáticas) que pueden presentar más. Los centriolos vistos al microscopio óptico se observan como dos pequeños puntos, pero, observados al microscopio electrónico se observan formados por una pared de microtúbulos. Esta pared, cuando se corta transversalmente, se aprecia que está constituida por nueve grupos de tres microtúbulos (tripletes), los que se disponen simétricamente y equidistantes entre sí. La matriz pericentriolar es densa, y hacia ella convergen microtúbulos citoplasmáticos. Los centriolos se originan formando un ángulo de 90° los tripletes se forman mediante un mecanismo de ensamblaje de tubulina, similar al de la formación de los microtúbulos. Estos corpúsculos desempeñan una serie de importantes actividades en la organización del movimiento interno de distintos componentes de la célula. (Alberts et al., 2006).

1.1.4.- NÚCLEO.

El núcleo ha sido considerado como el centro de gobierno de las funciones celulares; suele ser la estructura más voluminosa de las células, separada de manera imperfecta del resto del citoplasma por una membrana que muestra grandes poros. Es el principal organelo celular, ya que contiene el material genético constituido por ADN junto con proteínas especiales llamadas histonas. El núcleo es generalmente grande, posee una membrana porosa y en su interior se encuentra el ADN como una maraña de hilos delgados, llamada cromatina. Cuando la célula comienza su proceso de división (cariocinesis), la cromatina se condensa y los cromosomas se hacen visibles como entidades independientes. El cromosoma es el material hereditario cuya principal función es conservar, transmitir y expresar la información genética que contiene. Una de las características de las células eucariotas es que presentan el material nuclear organizado y delimitado por una envoltura membranosa, a través de la cual se establece el intercambio de material con el citoplasma. Ese núcleo que se observa en la célula eucariota en períodos de no división, se denomina Núcleo en Interfase. En el núcleo se aprecia, limitándolo del citoplasma, la envoltura nuclear, y en el interior del núcleo se observan gránulos de cromatina de diferente tamaño, uno o dos nucléolos y la matriz nuclear. El tamaño del núcleo es de 5-15 μm aproximadamente y aunque las células más grandes son las que tienen un núcleo mayor, esto no constituye una regla. Lo que si existe para cada tipo celular es una relación entre el volumen del núcleo y el del

citoplasma. El número por células varia, aunque lo más frecuente es la presencia de un solo núcleo. Se pueden encontrar células con dos núcleos, como las células hepáticas o las cartilaginosas. Otros tipos de células presentan un mayor número de núcleos y se denominan multinucleadas, por ejemplo la fibra muscular esquelética. La forma del núcleo es variable, generalmente es de forma esférica, pudiendo presentarse de forma ovoide, arriñonada, fusiforme o alargada y multilobulada (Alberts et al., 2006).

El interior del núcleo, por otra parte, es una estructura relativamente uniforme cuando las células no están dividiéndose. En cuanto a su contenido, la parte más importante es el DNA y las proteínas que a él se asocian, así como las enzimas relacionadas en la duplicación del DNA y la transcripción, es decir, la síntesis de las diferentes moléculas de RNA a partir de la información contenida en el DNA. El DNA forma los cromosomas, que es como se agrupa para organizar la información "escrita" que contiene, en una especie de capítulos. No se conoce con precisión la forma en que los cromosomas se organizan dentro del núcleo; sin embargo, durante la meiosis, uno de los hechos más espectaculares es que la estructura nuclear se desintegra, y es posible identificarlos por su forma. Durante el tiempo en que las células no están en división los cromosomas no son visibles, y parece que todos se encuentran formando una masa uniforme y compacta en el interior del núcleo. El nucleolo se encuentra dentro del núcleo, un corpúsculo fácilmente identificable por medios ópticos. Aunque no se conocen todas sus funciones, sí se sabe que es el responsable de la síntesis del RNA de los ribosomas el llamado RNA ribosomal y que es el principal componente de esas partículas, que a su vez son las responsables de la síntesis de las proteínas. (Lodish et al., 2004).

1.1.5.- EL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO

Retículo endoplasmático: es una red de túbulos y sacos planos y curvos encargado de transportar materiales a través de la célula; su parte dura es el lugar de fijación de los ribosomas; el retículo liso es el sitio donde se produce la grasa y se almacena el calcio. El retículo endoplasmático está disperso por todo el citoplasma. Los materiales sintetizados son almacenados y luego trasladados a su destino celular. Esta formación se encuentra en todas las células. Consiste en un conjunto de túbulos dispuestos en forma de red, conectados unos con otros, que se distribuyen por toda la célula. Es posible distinguir dos tipos en esta estructura: el retículo endoplásmico liso y el rugoso, que se diferencian por su aspecto. Ambos presentan en la microscopía electrónica la misma imagen tubular, pero en el liso los contornos son suaves y continuos, mientras que en la variedad rugosa, como su nombre lo indica, existen partículas más o menos abundantes a todo lo largo del contorno, que no son otra cosa que ribosomas, estructuras supramacromoleculares. Debido a que en esta estructura se encuentran los ribosomas, y a que la variedad rugosa es más abundante en los tejidos en los que hay una actividad importante de síntesis de proteínas sumados a muchos otros datos experimentales, uno de los cuales ha sido el aislamiento de los ribosomas y su estudio se le ha asignado como su actividad primordial la síntesis de las proteínas. En las células hepáticas, por ejemplo, hay un equilibrio entre las dos variedades de retículo endoplásmico. Salvo por la ausencia de granulaciones, el retículo endoplásmico liso tiene la misma apariencia que el rugoso; esta estructura, en el hígado, se vuelve más abundante cuando se administra a los animales algunas sustancias tóxicas o

medicamentos, y se aumenta su capacidad para activarlas o inactivarlas; por ello se le ha relacionado con la capacidad de "destoxificar" algunas sustancias ingeridas, dentro de las cuales se encuentran ciertos medicamentos. La abundancia de este sistema en algunos tejidos, como por ejemplo en parte de la glándula suprarrenal y del testículo, que se encargan de producir constantemente hormonas de las llamadas esteroideas, ha hecho suponer que tiene que ver con este proceso (Mayr, 1982).

En este sistema membranoso parece residir también una vía de síntesis para los ácidos grasos, principales componentes de la mayoría de los lípidos, así como de los fosfolípidos. En el músculo, el retículo endoplásmico tiene una función especial, pues requiere de una disposición regular en relación con las miofibrillas; esto, aunado al hecho de que posee una gran capacidad para transportar calcio, así como una gran cantidad de evidencias experimentales de otro tipo, permite asegurar que participa en la regulación de la contracción muscular. La regulación del proceso se hace mediante el secuestro o la liberación del ion calcio al citosol, en donde se encuentran las miofibrillas, que lo requieren para contraerse. Es necesario señalar, además, que las características funcionales de esta estructura varían según el tipo celular que se utilice (Mayr, 1982).

1.1.6.- EL APARATO DE GOLGI

En aparato de Golgi varias estructuras vesiculares se apilan unas junto a otras, generalmente cerca del núcleo celular; esta disposición también aparece en las células que tienen funciones secretoras y a partir de las vesículas grandes cercanas al núcleo, forma, con los productos de su secreción, vesículas más pequeñas que viajan luego hasta la superficie de la célula, se funden con la membrana externa y vacían su contenido al exterior. Esta estructura tiene también que ver con la producción de enzimas digestivas, y se observa con mucha claridad por ejemplo en el páncreas, en las células de la pared intestinal y en otras glándulas. Se ha estudiado ahora este sistema con más detalle, y se descubrió que las vesículas que forma pueden llevar proteínas, no sólo al exterior de la célula, sino también algunas que se insertan sólo en la membrana plasmática y en otros organelos. Así, el papel del aparato de Golgi se vuelve una especie de correo o sistema de distribución de las proteínas de las células a los sitios donde deben cumplir su función. No sólo eso, también en algunas ocasiones, las proteínas pueden regresar de la membrana al aparato de Golgi, en una especie de ciclo, que puede regular ciertas funciones, al modificar la cantidad de enzimas o receptores que se encuentran en una membrana. El aparato de Golgi también se encarga de producir y distribuir las proteínas que sintetiza a todos los organelos celulares. Una vez sintetizadas, las procesa e incluye en vesículas que se dirigen a los distintos organelos de las células, a los que se incorporan para realizar funciones especiales (Guarente y Kenyon, 2000).

1.1.7.- LAS MITOCONDRIAS

El mecanismo de la transformación de la energía que lleva a la síntesis del ATP, y que se conoce como fosforilación oxidativa, se inició y se ha realizado principalmente en estos organelos. Se trata de un doble saco cerrado, es decir, que tiene una doble

membrana, la externa y la interna; entre ambas queda un espacio intermembranal. Además, la membrana interna se pliega sobre sí misma, y los pliegues que se forman constituyen las llamadas crestas mitocondriales, que aumentan notablemente la superficie de la membrana interna, muy posiblemente para darle mayor capacidad funcional. El espacio contenido dentro de la membrana interna recibe el nombre de matriz mitocondrial (Mazzarello, 1999).

Las mitocondrias se encargan de diferentes funciones, pero la principal de ellas es la fosforilación oxidativa; para realizarla cuentan con una complicada serie de moléculas en su membrana interna, que se encargan de llevar átomos de hidrógenos y electrones de diferentes sustancias que provienen de los alimentos, al oxígeno y que en conjunto se conocen como la cadena respiratoria o cadena de transporte de electrones. En la transformación de la energía la función de las mitocondrias comprende primero la producción de varias sustancias, mediante el proceso que se conoce como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, también llamado ciclo de Krebs, en honor del científico que llegó a integrarlo (Dante, 2002). Una mitocondria, para producir el ATP hace lo siguiente:

a) A partir de las diferentes sustancias que se producen en el ciclo de Krebs toma átomos de hidrógeno o electrones para llevarlos al oxígeno mediante la cadena respiratoria. La unión de los hidrógenos con el oxígeno da lugar a la formación de moléculas de agua. Además, durante la operación del ciclo de Krebs, las sustancias que provienen del metabolismo se convierten en CO_2 .

b) La cadena respiratoria, localizada en la membrana interna de la mitocondria, toma los hidrógenos, completos, aunque en partes de ella sólo toma sus electrones, y los une finalmente, pero llevándolos gradualmente hacia él, con el oxígeno. De paso, la mitocondria es entonces el lugar en que realmente se realiza la respiración de las células. Incluso la respiración de los organismos completos no es otra cosa que la suma de la respiración de las mitocondrias de todas sus células. El pulmón sólo toma del aire el oxígeno que se necesita y lo envía por medio de la sangre a los tejidos y a las mitocondrias de sus células, y recoge el bióxido de carbono que producen.

c) Los hidrógenos (compuestos cada uno de un protón y un electrón) que provienen de la oxidación de los sustratos, principalmente por el ciclo de Krebs, pasan a la cadena respiratoria, para llevarlos al oxígeno, y tomar la energía derivada de ese transporte para "bombear" protones al exterior, generando una diferencia de concentración de éstos entre el interior y el exterior. Dado que la membrana impide su regreso, la acumulación relativa de hidrogeniones en el exterior y su tendencia a regresar, se convierte realmente en otra forma de energía, que puede ser utilizada por la célula de la misma manera que un sistema adecuado aprovecha la energía de una caída de agua para convertirla en energía eléctrica, o mecánica, por ejemplo.

d) La mitocondria cuenta con una proteína, la cual, tomando la energía del regreso de los protones, es capaz de unir al adenosín difosfato (ADP), con un fosfato más, para formar el ATP. De esta forma, las mitocondrias, de manera asombrosa y eficiente, se encargan de transformar la energía de los enlaces químicos de los intermediarios del metabolismo, en los enlaces químicos del ATP, que representa la forma de energía que es aprovechada directamente por la mayoría de los procesos celulares que la requieren. Debido a esto, se dice que la mitocondria es como la "casa de máquinas" de la célula (Dante, 2002). Además, siendo la mitocondria una estructura cerrada debe contar con sistemas adecuados para transportar del exterior las sustancias que necesita para su funcionamiento. Cuenta con transportadores específicos y muy variados para el movimiento de muchas sustancias, entre las que destacan, desde luego, el ADP y el fosfato, que vienen del exterior, y el ATP, que debe salir para ser utilizado; además, hay una serie muy larga de otras sustancias necesarias, no sólo para la fosforilación

oxidativa, sino también para otras funciones, cada una de las cuales tiene un sistema de transporte. La mitocondria realiza otras funciones. Una de las más importantes es la fragmentación de los ácidos grasos, que son moléculas largas, formadas por una cadena de unos 16 a 18 átomos de carbono e hidrógeno. A partir de los carbohidratos, el material que recibe la mitocondria es el ácido pirúvico (en forma de piruvato). En la degradación de las proteínas recibe aminoácidos, que también debe modificar para aprovecharlos en el ciclo de Krebs; requiere entonces una gran variedad de enzimas que transforman a todas estas moléculas en fragmentos de dos átomos de carbono, principal fuente de alimentación de este sistema metabólico (Dante, 2002).

1.1.8.- LOS LISOSOMAS

Son organelos limitados por una membrana; las poderosas enzimas que contienen, degradan los materiales peligrosos absorbidos en la célula, para luego liberarlos a través de la membrana celular. Es decir, los lisosomas constituyen el sistema digestivo de la célula. Los lisosomas son estructuras membranosas cerradas, constituidas por una sola membrana, y son más pequeños que las mitocondrias. Estos organelos representan los elementos necesarios para degradar compuestos intracelulares en caso necesario, al poner en libertad las enzimas que contienen, que se puede considerar destructivas. Otro de los papeles de los lisosomas tiene lugar en algunas células, como las amibas o algunos leucocitos, que cuando capturan por fagocitosis alguna partícula del medio ambiente, forman una vesícula de la membrana plasmática a su alrededor. Esta vesícula se cierra y luego se funde con un lisosoma, y las enzimas de éste se encargan de digerir la partícula extraña (que puede ser una bacteria, por ejemplo) que ha sido fagocitada (Mayr, 1982).

1.1.9.- LOS MICROTÚBULOS Y LOS MICROFILAMENTOS

Estas estructuras, como su nombre lo indica, representan formaciones de apariencia tubular o filamentosa que se encuentran en el interior de prácticamente todas las células, con características y disposición a veces constantes y otras veces variables; se encuentran en el citoplasma, ya sea aislados o asociados con centriolos, cilios y flagelos. Están compuestos por proteínas llamadas tubulinas y tienen la capacidad de contraerse. Estas estructuras intervienen en el movimiento celular primitivo, como por ejemplo el de tipo amiboide de las amibas y los glóbulos blancos. También participan en los movimientos del citoplasma celular, en la llamada ciclosis, o en el movimiento de sustancias, o hasta de vesículas dentro de las células; muchos de estos movimientos están dirigidos por los microtúbulos. También los centriolos, que tienen una función tan importante durante la división celular, pues parecen dirigirla están formados por microtúbulos (Horiike et al., 2001).

Durante esta etapa de la vida celular, los microtúbulos también se asocian para constituir haces más gruesos, que constituyen el huso acromático. Los microfilamentos son estructuras semejantes a los microtúbulos, formados por distintos tipos de proteínas, de las cuales las más conocidas son la actina y la miosina, que se encuentran en el músculo. Estas estructuras han sido objeto de muchísimos estudios, y gracias a ellas se sabe que son las responsables de la contracción muscular. Las fibras de actina y de

miosina se deslizan unas sobre otras, al tiempo que rompen al ATP, y con su energía producen el acortamiento de las fibras y de las células que las contienen (Horiike et al., 2001).

1.1.10.- LA DIVISIÓN CELULAR

La división celular es uno de los fenómenos más espectaculares de la naturaleza; tanto desde el punto de vista morfológico, como del bioquímico. Antes de iniciarse tiene lugar la duplicación del DNA. Mediante ella se hacen dos copias idénticas del DNA, las cuales irán a dar a cada una de las dos células hijas resultantes. También se elaboran las proteínas que lo recubren, de modo que, antes de iniciarse el proceso visible de la división celular, ya se han generado dos "juegos" de cromosomas. En el siguiente paso se observa la fase visible del fenómeno, en el cual se distribuyen los cromosomas para las futuras células hijas, y se divide la célula madre, además, produce la modificación y la interacción concertada de prácticamente todo el interior de la célula. La división celular consiste clásicamente en: interfase: es la fase de la célula cuando no está reproduciéndose (Dante, 2002). Tiene varias fases:

- G₁ o gap o grout, que dura de 8 a 10 horas
- S: se produce la copia de la doble cadena de ADN, dura de 6 a 8 horas
- G₂ o gap o grout, dura de 6 a 8 horas

Las células que no se pueden reproducir no pasan de la fase G₁

1.1.10.1.- MITOSIS

Mitosis es la división nuclear más citocinesis, y produce dos células hijas idénticas durante la profase, prometafase, metafase, anafase y telofase. La interfase frecuentemente se incluye en discusiones sobre mitosis, pero la interfase técnicamente no es parte de la mitosis, más bien incluye las etapas G₁, S y G₂ del ciclo celular. Se divide en varias fases: (Dante, 2002).

Interfase: La célula está ocupada en la actividad metabólica preparándose para la mitosis (las próximas cuatro fases que conducen e incluyen la división nuclear). Los cromosomas no se disciernen claramente en el núcleo, aunque una mancha oscura llamada nucleolo, puede ser visible. La célula puede contener un par de centriolos (o centros de organización de microtubulos en los vegetales) los cuales son sitios de organización para los microtubulos.

Profase: La cromatina en el núcleo comienza a condensarse y se vuelve visible en el microscopio óptico como cromosomas. El nucleolo desaparece. Los centriolos comienzan a moverse a polos opuestos de la célula y fibras se extienden desde los centrómeros. Algunas fibras cruzan la célula para formar el huso mitótico. Se produce la copia de la doble cadena de ADN, la formación de los cromosomas y la formación de microtúbulos. Los microtúbulos de los centriolos se pueden unir al cinetocentro (que se encuentra en el centro del cromosoma, cerca del centrómero), no unirse al cinetocentro o formar el ASTER.

Prometafase: La membrana nuclear se disuelve, marcando el comienzo de la prometafase. Las proteínas se adhieren a los centrómeros creando los cinetocoros. Los microtubulos se adhieren a los cinetocoros y los cromosomas comienzan a moverse.

Metafase: Fibras del huso alinean los cromosomas a lo largo del medio del núcleo celular. Esta línea es referida como, el plato de la metafase. Esta organización ayuda a asegurar que en la próxima fase, cuando los cromosomas se separan, cada nuevo núcleo recibirá una copia de cada cromosoma. Se forma la placa ecuatorial ya que todos los cromosomas se disponen en el plano ecuatorial (en el centro).

Anafase: Los pares de cromosomas se separan en los cinetocoros y se mueven a lados opuestos de la célula. El movimiento es el resultado de una combinación de: el movimiento del cinetocoro a lo largo de los microtubulos del huso y la interacción física de los microtubulos polares. El centrómero se rompe y las cromátidas (cada una de las dos partes en que se divide el cromosoma) migran hacia los polos de la célula. Esto ocurre porque las fibras cromosómicas se acortan.

Telofase: Las cromátidas llegan a los polos opuestos de la célula, y nuevas membranas se forman alrededor de los núcleos hijos. Los cromosomas se dispersan y ya no son visibles bajo el microscopio óptico. Las fibras del huso se dispersan, y la citocinesis o la partición de la célula pueden comenzar también durante esta etapa. Se produce la citocinesis: división en dos de la célula.

Citocinesis: En células animales, la citocinesis ocurre cuando un anillo fibroso compuesto de una proteína llamada actina, alrededor del centro de la célula se contrae pellizcando la célula en dos células hijas, cada una con su núcleo.

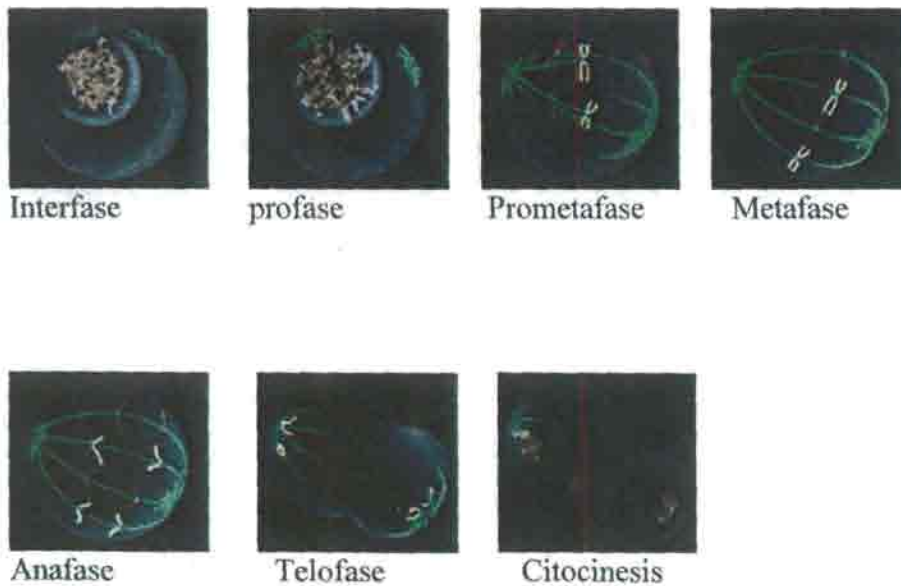


Fig. 1 Alberts et al., 2004: *Fases mitóticas de la división celular*

1.1.10.2.- MEIOSIS

En meiosis 1, los cromosomas en una célula diploide se segregan nuevamente, produciendo cuatro células hijas haploides. Este es el paso de la meiosis que genera diversidad genética. Las fases de la meiosis 1 y 2 son:

Profase I: La replicación del ADN precede el comienzo de la meiosis I. Durante la profase I, los cromosomas homólogos se aparean y forman sinapsis, un paso que es único a la meiosis. Los cromosomas apareados se llaman bivalentes, y la formación de quiasmas causada por recombinación genética se vuelve aparente. La condensación de los cromosomas permite que estos sean vistos en el microscopio. El bivalente tiene dos cromosomas y cuatro cromátidas, con un cromosoma de cada padre. Se constituyen los cromosomas y se produce el intercambio de material genético entre ellos (recombinación genética).

Prometáfase I: La membrana nuclear desaparece. Un cinetocoro se forma por cada cromosoma, no uno por cada cromátida, y los cromosomas adosados a fibras del huso comienzan a moverse.

Metafase I: Bivalentes, cada uno compuesto de dos cromosomas (cuatro cromátidas) se alinean en el plato de metafase. La orientación es al azar, con cada homólogo paterno en un lado. Esto quiere decir que hay un 50% de posibilidad de que las células hijas reciban el homólogo del padre o de la madre por cada cromosoma. Los cromosomas se sitúan en el plano ecuatorial y unen sus centromeros a los filamentos del huso acromático.

Anafase I: Los quiasmas se separan. Los cromosomas, cada uno con dos cromátidas, se mueven a polos opuestos. Cada una de las células hijas ahora es haploide (23 cromosomas), pero cada cromosoma tiene dos cromátidas. Los filamentos del huso se contraen arrastrando los cromosomas hacia los polos celulares.

Telofase I: Las envolturas nucleares se pueden reformar, o la célula puede comenzar rápidamente meiosis II. Los cromosomas se agrupan en los polos y se produce la división citoplasmática. Las células hijas son haploides pues no tienen dos juegos homólogos de cromosomas, sino uno solo. Cada uno de los cromosomas de este juego está constituido por dos cromátidas unidas por el centrómero. Aquí termina la meiosis 1 (se completa con la citocinesis).

Citocinesis: Análoga a la mitosis donde dos células hijas completas se forman.

La meiosis II es similar a la mitosis. Sin embargo no hay fase "S". Las cromátidas de cada cromosoma ya no son idénticas en razón de la recombinación. La meiosis II separa las cromátidas produciendo dos células hijas, cada una con 23 cromosomas (haploide), y cada cromosoma tiene solamente una cromátida.

Profase 2: se produce la duplicación de los centriolos y la formación del huso acromático.

Metafase 2: los cromosomas se disponen ecuatorialmente y sus centrómeros se fijan a los filamentos del huso.

Anafase 2: los filamentos del huso se contraen separando las cromátidas.

Telofase 2: Finalmente, se produce la citocinesis o división del citoplasma y la división celular. Durante la telofase, o fase final, la porción ecuatorial de la célula se empieza a estrangular para dar lugar a dos células que regresan a su estado original. No son todos los elementos participantes provienen del núcleo de la célula, aunque parezca que el fenómeno tiene su origen en el núcleo y que lleva a la formación de dos nuevas células, habitualmente con las mismas características que la célula madre (Mazzarello, 1999). Empieza de interfase y termina en telofase II dando cuatro células hijas idénticas.

Cuando ya no se requieren más células, estas entran en un estado denominado G_0 , en el cual abandonan el ciclo celular y entran en un periodo de latencia, lo cual no significa que entren en reposo ya que éstas células presentan un metabolismo activo, pues si estas células reciben el estímulo adecuado abandonan el estado G_0 y entran al G_1 . Algunas poblaciones celulares altamente especializadas como las fibras musculares o neuronas al entrar en estado G_0 abandonan indefinidamente el ciclo celular (Cooper, 2000).

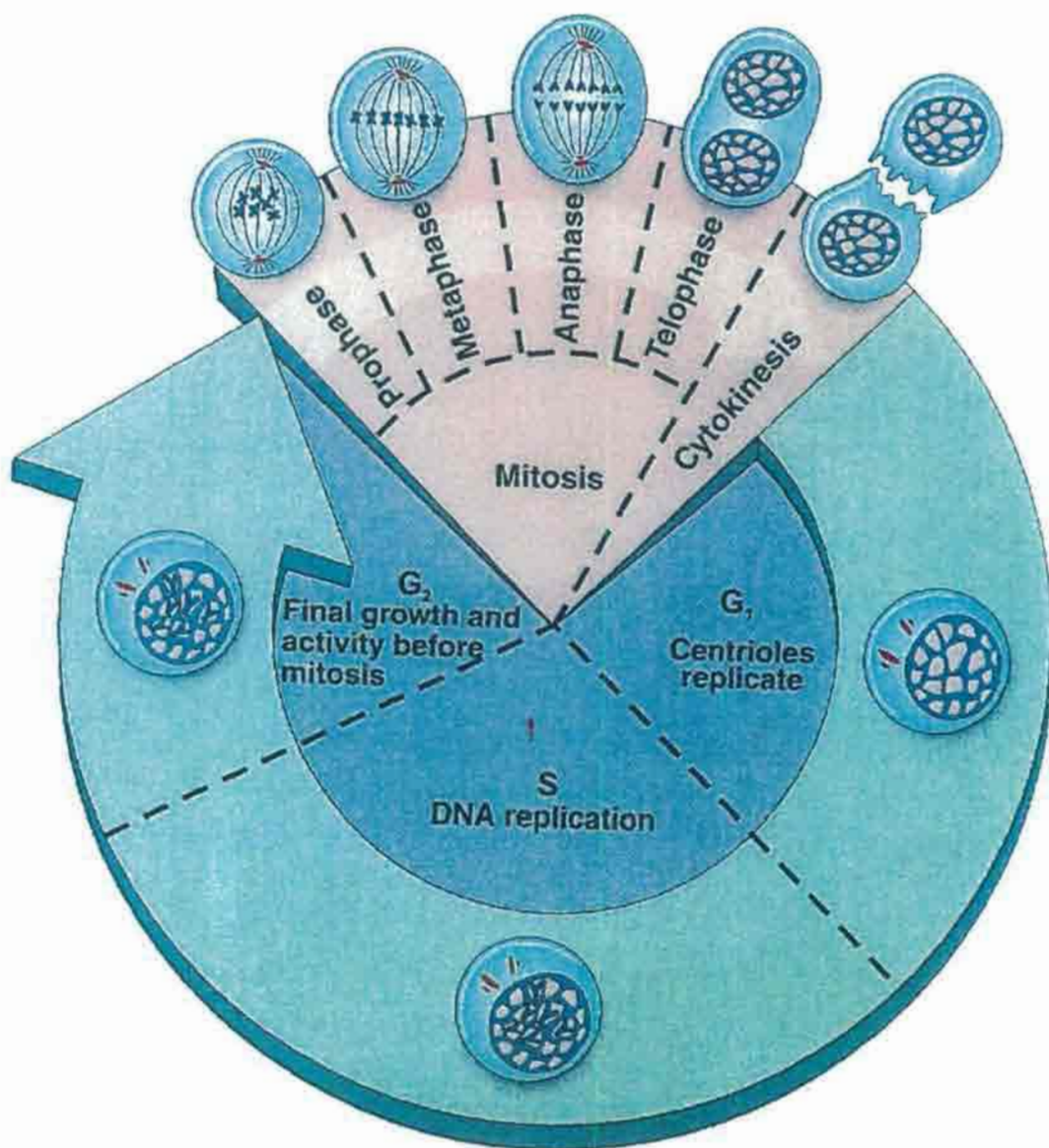


Fig. 2: Alberts et al., 2004: *La división celular y de sus fases.*

Conclusiones: Una célula humana tiene 46 en total o 23 pares de cromosomas. A continuación de la mitosis, las células hijas tendrán cada una un total de 46 cromosomas. Después de la meiosis I, las dos células hijas tendrán 23 cromosomas, y después de la meiosis II 23 cromosomas. Esto se debe a que el número de cromosomas se reduce a la mitad durante la primera división meiotica y el número de cromosomas está determinado por el número de centrómeros, y no el número de cromátidas.

El proceso de meiosis produce cuatro células con cromosomas no idénticos. Esta diversificación ocurre durante: La profase I incluye la recombinación del material genético y la disposición al azar de los pares homólogos, produciendo la diversificación de las células haploides resultantes.

Considerando la mitosis con Meiosis, el cromosomas homólogos se comportan independientemente porque el apareo de cromosomas homólogos que permite segregación independiente e intercambio de segmentos es único a la meiosis. En la mitosis, los cromosomas homólogos se comportan independientemente.

El estado de meiosis donde las células se vuelven haploide es anafase I: La separación de pares homólogos ocurre en anafase I. Aunque cada cromosoma tiene dos cromátidas, el número total de cromosomas es 23 para los humanos después de anafase I de meiosis I. Es importante recordar que el número de cromosomas está determinado por el número de centrómeros.

Uno de los más tempranos eventos que distingue la meiosis ocurre en profase I e involucra: el apareamiento de cromosomas homólogos es único a la meiosis, y permite el intercambio de segmentos.

Meiosis II, más se parece a los eventos de la mitosis excepto que las células son haploide (Sí, los eventos de la meiosis II son similares a la mitosis con células haploides). Y durante la anafase, un cinetocoro libre, formado por la rotura de una fibra del huso adosada, resulta en un inmediato bloqueo del proceso. Este resultado muestra que las células tienen mecanismos para asegurar que no se cometan errores durante la anafase: esta observación es totalmente correcta. Los científicos están trabajando sobre los mecanismos por los cuales el desprendimiento es detectado, un proceso que probablemente involucra la fosforilación (Alberts. et al. 2002).

1.1.10.3.- REGULACIÓN INTRACELULAR

El control interno del ciclo celular está a cargo de proteínas, cuyas acciones podrían resumirse en series de activaciones e inhibiciones de otras proteínas, que son indispensables durante las fases del ciclo. Los principales efectores de esta regulación, son dos: las proteínas que permiten el progreso del ciclo: 1) los complejos cdk-ciclina y las proteínas que las inhiben y 2) dos pequeñas familias de proteínas, las CIP y las INK4 (Alberts. et al. 2002). Los complejos cdk-ciclina están compuestos por 2 tipos de proteínas, las Cdk (cinasa dependiente de ciclina) y las ciclinas (que pasan por un ciclo de síntesis y degradación) (Fig. 3).

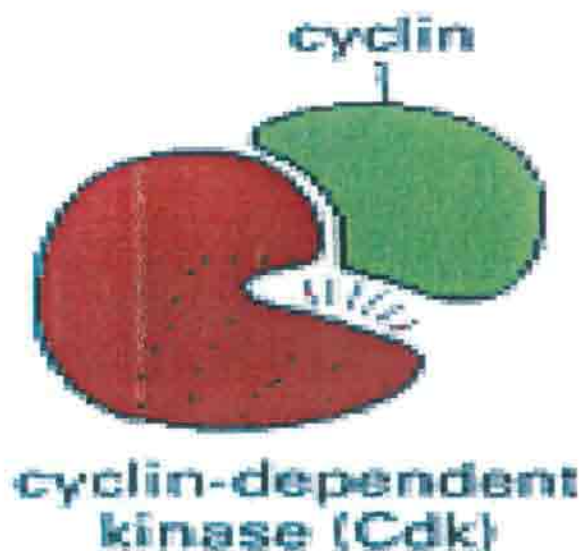


Fig. 3, Alberts. et al., 2002: *cinasa dependiente de ciclina (Cdk)*.

Se conocen seis cdk pero sólo se ha caracterizado la función de cuatro de ellas (cdk 1, 2, 4 y 6) mientras que de las ciclinas sólo se conocen 4 tipos (ciclina A, B, D y E). La cdk fosforila aminoácidos específicos de algunas proteínas, pero sólo si esta unida a una ciclina. Se conocen 6 distintas combinaciones de cdk-ciclina que actúan en tiempos específicos durante el ciclo (Lodish et al., 2000). (Fig. 4).

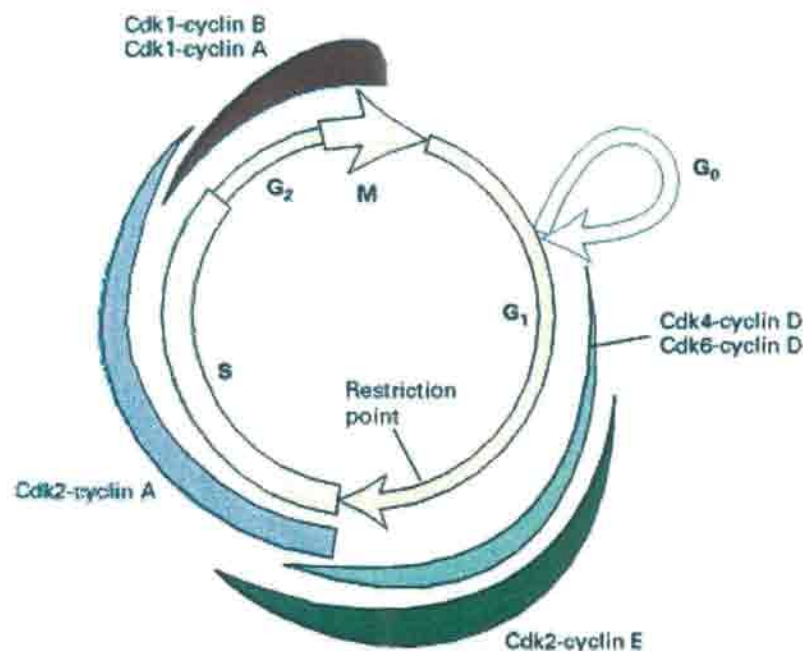


Fig. 4 Lodish et al., 2000: *Regulación intracelular*.

2) Se sabe que las células sintetizan proteínas inhibidoras de los complejos cdk-ciclina, que colaboran al control del ciclo celular. Estas proteínas se han agrupado en dos: las proteínas INK4 (inhibidoras de cinasa 4) y las CIP (proteínas inhibidoras de cdk's). Las INK4, se unen e inhiben sólo los complejos cdk4-ciclina D y cdk6-ciclina D, la única caracterizada es la p16 (p= fosfoproteína y el número es su peso en kDa). Las CIP se

unen e inhiben a todos los complejos que tengan cdk 1, 2, 4 y 6, actualmente se conocen las: p21, p27 y p53 (Fig. 5).

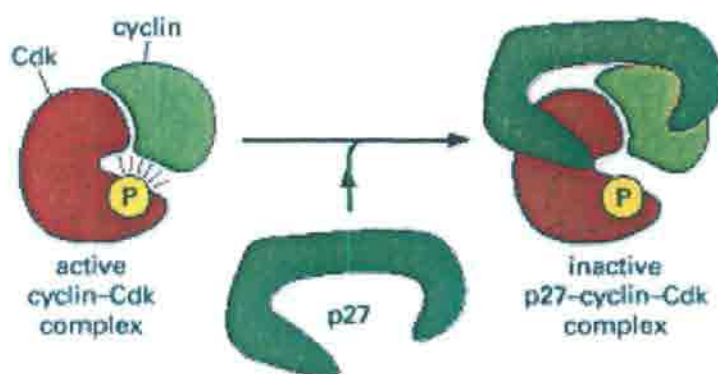


Fig. 5: Albert et al., 2002: Las p21, p27 y p53

Las proteínas INK4 y CIP, llamadas en conjuntos inhibidores de cdk (CKI), y algunos factores de transcripción (como el p53) tienen la función de impedir la proliferación celular. La mutación de los genes que las codifican y/o la pérdida de función de estas proteínas, resulta en la pérdida de control sobre el ciclo celular y la incapacidad para detenerlo, (proliferación celular con errores). Por su acción normal, a los genes que codifican estas proteínas se les denominaron “genes supresores de tumores”. Estas proteínas actúan en diferentes espacios de tiempo, permitiendo o inhibiendo el progreso adecuado del ciclo celular. Esta capacidad de orden, se debe principalmente, a que las proteínas (por ejemplo, las ciclinas) que no se utilizan, son eliminadas por un complejo de degradación llamado ubiquitinaproteasoma (Alberts et al. 2002). (Fig. 6).

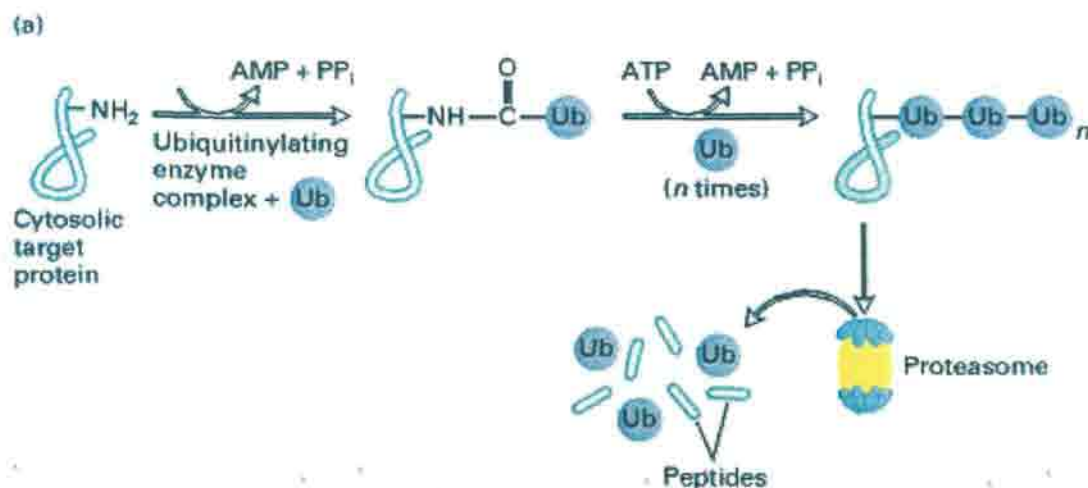


Fig. 6: Alberts et al., 2002: Ubiquitinaproteasoma.

En conclusión, el paso ordenado por cada una de las fases del ciclo celular, está altamente regulado por: los complejos cdk-ciclinas y sus inhibidores, entre otras

proteínas. Además, para el control del ciclo celular, se postularon cuatro puntos en los que se controla a la célula y al medio extracelular para dar lugar o restringir las acciones propias de cada una de las fases del ciclo. Estos cuatro puntos son: un punto de restricción y tres puntos de control (Alberts et al. 2002).

1.1.10.4.- PUNTO DE RESTRICCIÓN.

El punto de restricción se encuentra casi al final de G_1 , se conoce así puesto que si la célula lo pasa se encuentra “comprometida” irreversiblemente a entrar al ciclo celular, independientemente de lo que suceda en el exterior. Es muy importante entender, que este punto está principalmente controlado por el medio y depende de su capacidad de inducción, el que la célula se comprometa a completar el ciclo celular (Fig. 7). Los responsables intracelulares del paso a través de este punto, son los complejos cdk4 y cdk6 –ciclina D, que “liberan” al factor de transcripción E2F de la proteína Rb (proteína del Retinoblastoma), las cdk tienen que fosforilar al Rb para que libere a E2F. La fosforilación de la proteína Rb por las cdk-ciclina, permite la liberación del factor de transcripción E2F del complejo Rb-E2F. El E2F estimula la síntesis de cdk2 y ciclina E (necesarios para el progreso de G_1 a S), de proteínas necesarias para la síntesis de ADN y de él mismo, inactivando aún más Rbs y disminuyendo la concentración de p27. La inactivación de Rb es mantenida a lo largo del ciclo por la concentración de distintos complejos cdk-ciclina pero, una vez que las ciclinas se degradan, el Rb es de nuevo activo, y une al E2F (Lodish et al., 2000).

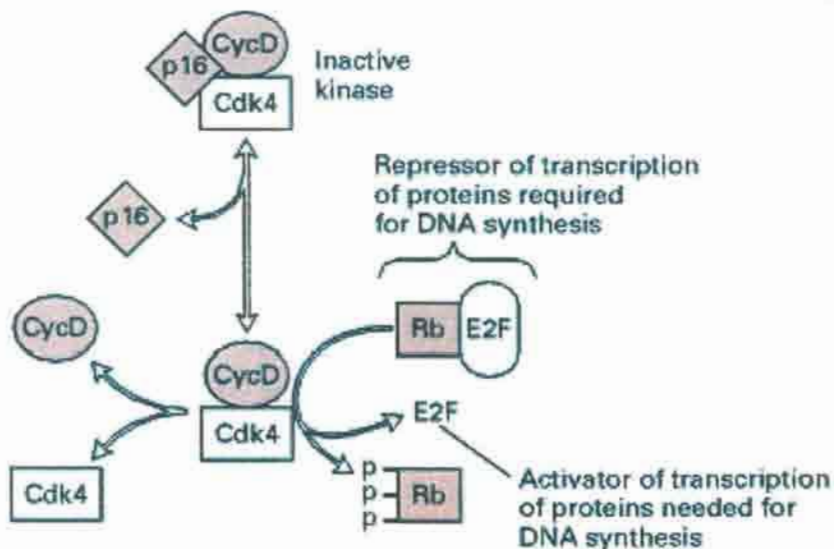


Fig. 7 Lodish et al., 2000; *Punto de restricción*.

El paso por este punto es también vigilado por la p16 (INK4), que como se describió antes, se encarga de inhibir a los complejos cdk4, 6 ciclina D. La p16 inhibe la unión de la cdk y la ciclina, se interpone entre ellos, por lo que son inactivos, esto es, el E2F no se puede liberar y en consecuencia no se pasa el punto de restricción. La acción de la p16 tiene que ver con el medio extracelular, pues se sabe que si no existen suficientes señales del exterior (mitógenos, factores de crecimiento, nutrientes, etc.) p16 y p27 tienden a acumularse, por lo que se hacen muy activos. La fosfoproteína p27 es

una CIP, y su importancia radica en que no sólo se encarga de suprimir la actividad de los complejos cdk-ciclinas activos en los primeros dos puntos de control, sino que además, ayuda a retirar a la célula del ciclo celular llevándola a G_0 (Alberts et al., 2002). Las siguientes preguntas surgen: ¿El ADN ha sido replicado? ¿El ambiente es favorable? ¿El ADN está intacto? ¿Todos los cromosomas se han unido al huso mitótico? ¿El ADN está intacto? ¿El ambiente es favorable?

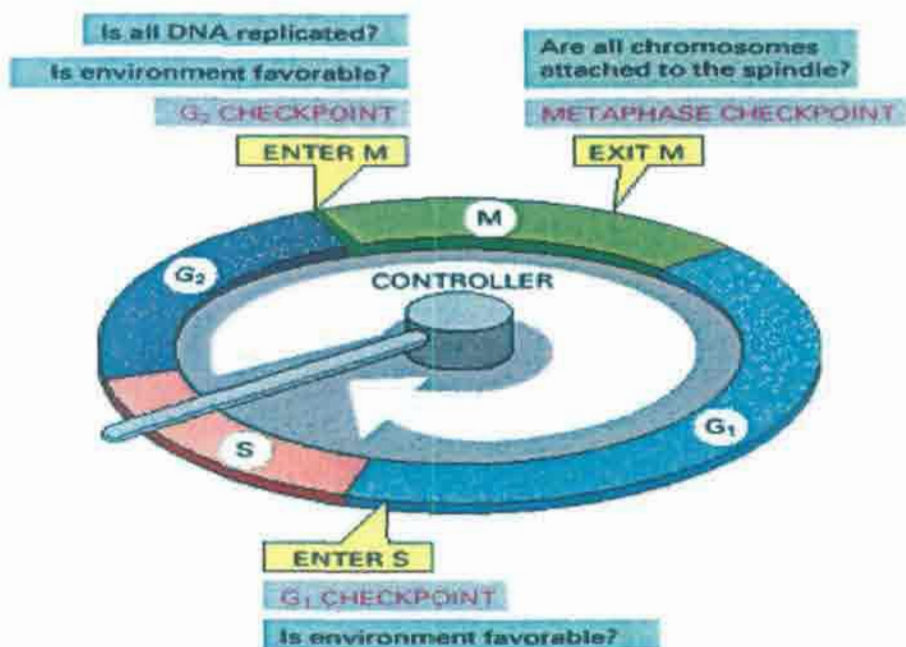


Fig. 8 Alberts et al., 2002: *Punto de control 1*

1.1.10.5.- PUNTOS DE CONTROL

Los puntos de control son, por así decirlo, pequeños retenes donde se revisan distintas características del medio y de la célula misma, la célula debe estar sana y el medio debe ser lo suficientemente bueno para que se continúe el ciclo celular. Pero además de ello, los controladores implicados en estos puntos tienen la capacidad de “llamar” a otros a reparar, cuando por ejemplo el material genético está dañado, o a terminar distintos procesos. (Fig. 8). El primer punto de control, se encuentra justo después del punto de restricción, aún en G_1 (Fig. 8). En general se podría decir que el primer control se encarga de: 1) revisar las condiciones del medio, buscando factores externos que induzcan el progreso del ciclo celular, 2) revisar que la célula haya crecido lo suficiente y 3) que el material genético esté intacto (Nelson y Cox, 2000).

La búsqueda de factores externos es muy importante, pues éstos estimulan la síntesis de proteínas como algunas cdk's y ciclinas, y sin estas, la continuación y el control del ciclo celular serían imposibles. Participan en este puesto, el complejo cdk2-ciclina E, que como los implicados en el punto de restricción, también se encarga de inactivar a Rb y de favorecer el trabajo de E2F para que estén listas las enzimas necesarias para comenzar la síntesis de ADN en la fase S. Los encargados de la inhibición en este punto de control son un factor de transcripción y una CIP: la p53 y la p21, en ese orden. La p53 es uno de las más conocidas supresoras de tumores, usualmente se encuentra en la célula pero es muy inestable en condiciones normales

porque se encuentra unido a otra proteína llamada Mdm2, que funciona como un “marcador” para que la p53 se degrade. Pero, si existe una lesión en el ADN, distintas enzimas se activan, éstas ayudan a separar la p53 de su marcador, una mayor concentración de p53 estimula la síntesis de p21 (CIP) que se une a cdk2 y ciclina E, inhibiendo la acción del complejo. La célula entonces no puede entrar a S (Nelson y Cox, 2000).

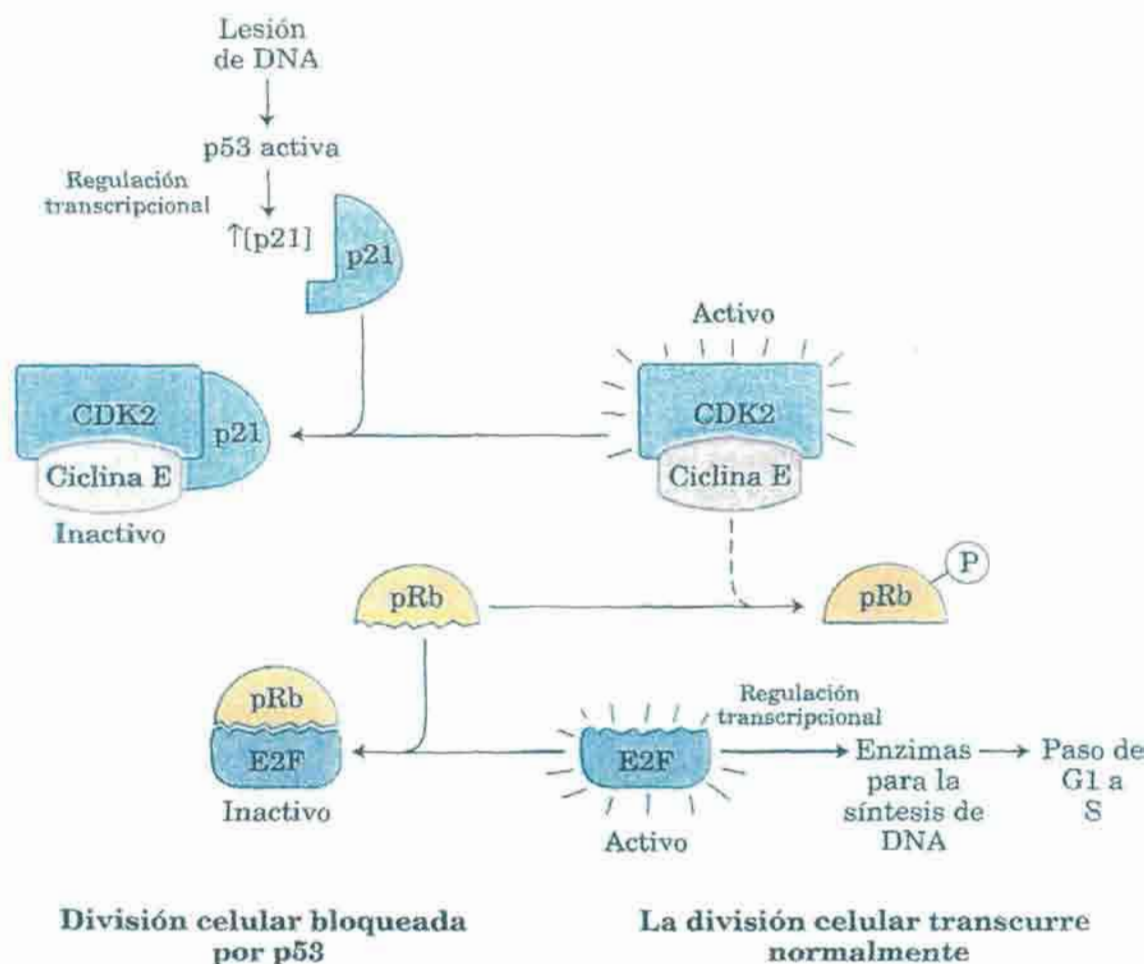


Fig. 9 Nelson y Cox, 2000: *Puntos de control 2*

En la fase sin punto de control, a fase S no tiene como tal un punto de control, aun cuando algunos autores los consideran; sin embargo es indispensable la presencia del complejo cdk2-ciclina A para que la síntesis de ADN se lleve a cabo (Fig. 10). Como se explicó antes, durante la fase S el ADN se replica, para ello es necesario que se arme la maquinaria específica. Dentro de ellas hay un conjunto de proteínas conocido como complejo de reconocimiento del origen u ORC que reconocen secuencias bien definidas de bases en el ADN llamadas orígenes de replicación. Durante la fase G₁, se forma el ORC, tras el cual otras proteínas (como cdc6 y mcm) se unen para formar el complejo de prereplicación (pre-RC). El complejo cdk2-ciclina A se encarga de deshacerse de las proteínas del pre-RC y de unir las enzimas necesarias para la replicación (como la ADN polimerasa). Así se asegura que la maquinaria de

replicación no vuelva a armarse hasta que se haya terminado el ciclo y la replicación sólo ocurra una sola vez (Alberts et. Al., 2002).

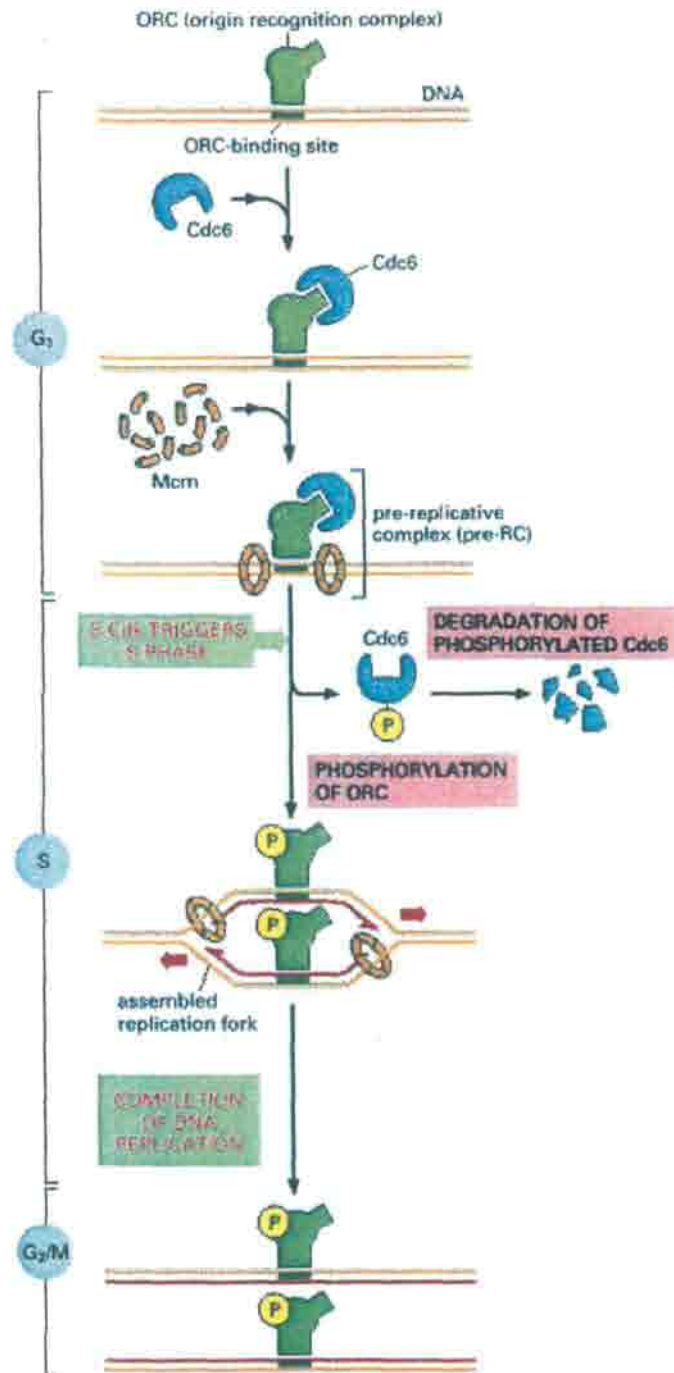


Fig. 10 Alberts, et al. 2002: *Fase sin punto de control*.

Segundo punto de control se encuentra al final de G₂. Los complejos cdk1-ciclina A y ciclina B permiten el paso a través de este punto. En conjunto la actividad de estos dos complejos se denominó Factor Promotor de la Mitosis (MPF). A grandes rasgos, el segundo punto de control se encarga de revisar: 1) que el material genético se haya duplicado completamente, 2) que el material genético no tenga errores y 3) que el medio extracelular sea adecuado. Se sabe que una vez activado el complejo cdk-ciclina,

éste se encarga de llevar a cabo tareas indispensables durante las primeras subfases de la mitosis. En resumen, los complejos cdk1-ciclina A y ciclina B, se encargan de inducir el ensamble del huso mitótico y en parte de asegurarse de que los cromosomas se unan a éste. Se encarga además: de iniciar la condensación del material genético, activando un grupo de proteínas conocidas como condensinas, de desensamblar la envoltura nuclear fosforilando las láminas nucleares, de armar nuevamente el citoesqueleto celular y de la reorganización del aparato de Golgi y el retículo endoplasmático. En este punto actúa también la p53, que como ya se explicó detecta alteraciones en el ADN y desencadena a la activación de la CIP p21 encargada de la inhibición de cualquier complejo cdk 1,2, 4 y 6-ciclina (Alberts, et al. 2002).

La separación de las cromátides hermanas sucede durante la anafase. Para que esto suceda es necesaria la actividad de varios complejos proteicos. El principal de éstos es el complejo promotor de la anafase (APC). Este complejo es activado por la unión de una proteína semejante a una cdk, llamada cdc20 (cdc= ciclo de división celular). Una vez activado, el APC se encarga de marcar a diversas proteínas para que se degraden, una de ellas es la securina, que inactiva a la separasa. Esta separasa es la proteína encargada de inactivar a las cohesinas eliminando las uniones entre las cromátides hermanas (Alberts, et al. 2002) (Fig. 11).

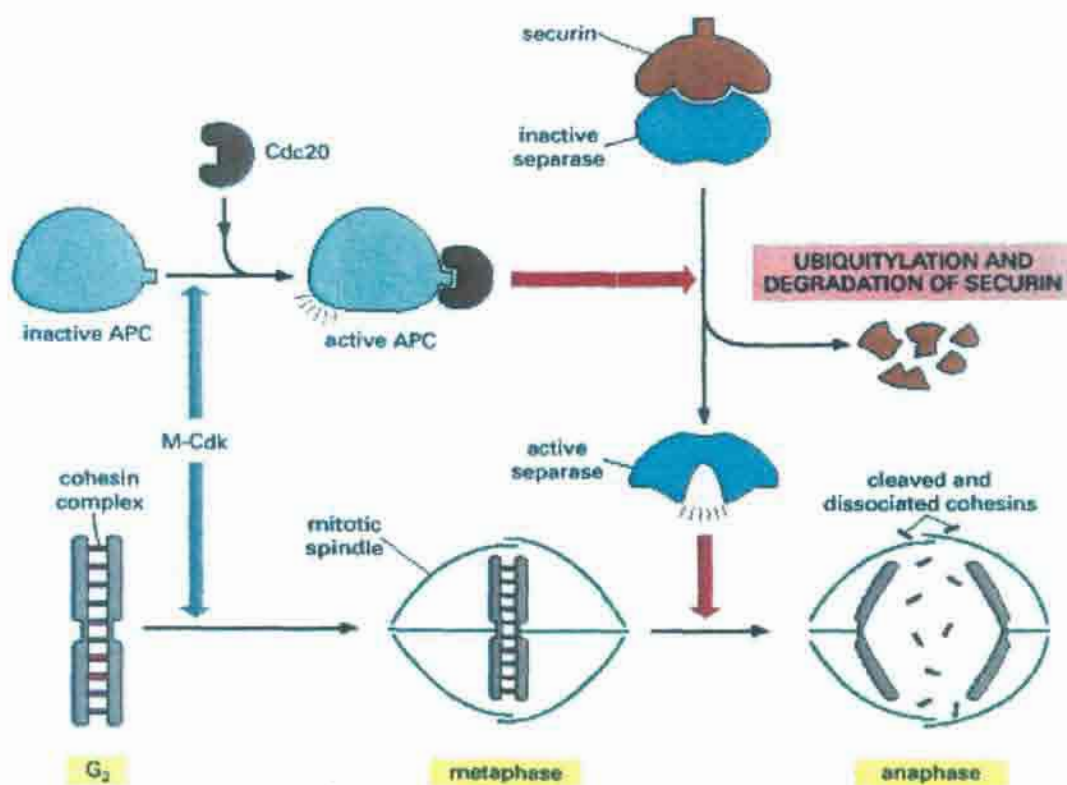


Fig.11 Alberts, et al. 2002: Separación de las cromátides hermanas.

Tercer punto de control se encuentra en la fase M, entre la metafase y la anafase. Se encarga de revisar que todos los cromosomas se hayan unido al huso mitótico. Si detecta que uno de los cinetocoros no se encuentra unido, manda una señal negativa al sistema de control bloqueando la activación de proteínas implicadas en la

separación de las cromátides hermanas. Específicamente inactiva al conjunto APC-cdc20, lo que inhibe la liberación de la separasa, impidiendo que las cromátides hermanas se separen hasta que la señal desaparezca (Gilbert, 2003).

1.1.10.6.- CONTROL EXTRACELULAR DEL CICLO CELULAR.

La forma y el tamaño de un organismo están definidos por los tres procesos fundamentales que dan forma y tamaño al individuo: el crecimiento celular, la muerte celular y la proliferación celular; esta última es el resultado del ciclo celular que como ya se explicó anteriormente, está regulado por mediadores intracelulares (ciclinas Cdk); cabe señalar que la entrada al ciclo celular no es un proceso autónomo de la célula, se requiere de la activación de estas vías (ciclinas-Cdk); a través de la señalización mediante factores solubles de naturaleza proteica denominados mitógenos. De esta manera las células en organismos multicelulares proliferan solo cuando se requieren más células. La mayoría de los mitógenos controlan la tasa de división celular actuando en la fase G₁; liberan el control negativo del ciclo celular permitiendo la entrada a la fase S. Actúan uniéndose a receptores de membrana con actividad de tirosina-quinasas los cuales activan a la proteína G monomérica Ras cambiándola de su estado unido a GDP por GTP; esta activación desencadena una cascada de fosforilaciones a través de las proteínas MAPK (quinasas activadas por mitógenos). A su vez estas proteínas MAPK transmiten el estímulo a diversas moléculas efectoras (quinasas de proteínas o factores de transcripción). Esta cascada de fosforilaciones ocasiona la transcripción de genes tempranos (entre los que destacan los que codifican a las ciclinas de G₁), algunos de estos genes a su vez activan la transcripción de otros genes denominados genes tardíos. De esta manera la vía de señalización Ras- MAPK transmite señales extracelulares al núcleo activando la maquinaria del ciclo celular (Alberts et al., 2002).

Muchos tipos celulares como los fibroblastos o las células epiteliales, requieren de adhesión a sustratos de la matriz extracelular (fibronectina o laminina), para crecer y proliferar en adición de las señales y medio adecuados. Este requerimiento se debe a que la unión de moléculas de matriz extracelular a integrinas (moléculas receptoras de matriz en la membrana celular, las cuales están unidas al citoesqueleto) activa otras vías de señalización requeridas para entrar al ciclo celular, mediadas por la activación de otras quinasas (FAK, quinasa de adhesión focal). Es necesario señalar que las células de mamífero no se dividen infinitamente, muchas células se dividen un número limitado de veces antes de diferenciarse en células altamente especializadas. Por ejemplo fibroblastos humanos en medio de cultivo estándar se dividen entre 25 y 50 veces, hacia el final la proliferación se disminuye su velocidad y finalmente se detiene a este fenómeno se le ha denominado senescencia replicativa (Gilbert, 2003).

En conclusión: El ciclo celular es un conjunto de procesos ordenados, que lleva a cabo la célula cuando se le ha instruido el dividirse; está dividido en interfase y mitosis. El control del ciclo celular se presenta a dos niveles, intracelular y extracelular. El control intracelular está a cargo de mediadores proteicos que ejercen un control negativo y positivo sobre el ciclo celular (cdk-ciclinas y CKI). Existen un punto de restricción y tres puntos de control los cuales son supervisadas por distintas combinaciones de cdk-ciclinas. La entrada al ciclo celular no es una decisión que la célula toma individualmente; se requiere de las señales adecuadas (mitógenos) ya sea del medio extracelular o de otras células. Cuando una célula no es necesaria o es una posible amenaza ésta puede morir por apoptosis ya sea por señales intracelulares o extracelulares.

1.1.11.- APOPTOSIS

La apoptosis o "muerte celular programada" es una forma de suicidio celular genéticamente definida, que ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario. Determinados hechos celulares pueden ser explicados por trastornos en la regulación de los genes responsables de la apoptosis, como es el caso de la transformación y la progresión tumorales (Ellis y Yuan, 1991).

Las células en un organismo forman una comunidad organizada, donde el número de células en esta comunidad está estrictamente regulado; si una célula ya no es requerida esta muere o se "suicida" por apoptosis. Este fenómeno es bastante común tanto en organismos en desarrollo como en adultos, lo cual podría parecer como un desperdicio ya que por lo general las células que mueren por apoptosis son células sanas (a diferencia de las células que mueren por necrosis); pero en realidad es un proceso necesario para la homeostasis y la morfogénesis; por ejemplo los dedos se separan por apoptosis del tejido que hay entre ellos en el primordio de la mano. La apoptosis a diferencia de la necrosis es un proceso ordenado, la célula muere "limpiamente" sin dañar a sus células vecinas con el contenido de su citoplasma, la célula se condensa y reduce su tamaño, se colapsa el citoesqueleto, la membrana nuclear se destruye, el DNA se fragmenta y finalmente la superficie de la célula cambia de manera que puede ser reconocida por células vecinas o macrófagos para ser fagocitada (Darnell, 2000). La maquinaria intracelular de la apoptosis depende de una familia de proteasas llamadas caspasas que cortan a la proteína blanco en residuos de aspartato. Las caspasas se encuentran en las células en forma inactiva (procaspasas) las cuales son activadas por un corte proteolítico, estas a su vez activan otras procaspasas en una cascada de amplificación (Fig. 12).

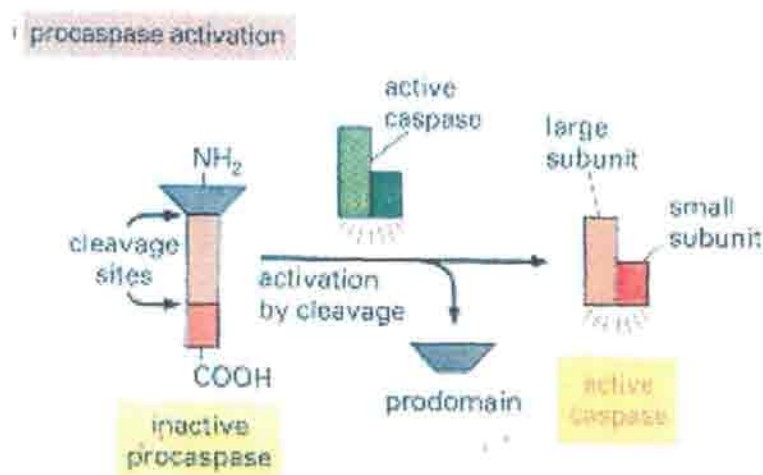


Fig. 12 Alberts, et al., 2002: *Activación e inactivación de las procaspasas.*

Las caspasas cortan proteínas clave en la célula como la laminina que al romperse desintegra la membrana nuclear y degradan a la enzima que inactiva a la DNAsa ocasionando la degradación del material genético. La entrada a la apoptosis al igual que la entrada a un nuevo ciclo celular es un “todo o nada”, donde una célula que ha iniciado este proceso no puede detenerse (Darnell, 2000). El mecanismo propuesto de la activación de estas procaspasas gira alrededor de proteínas adaptadoras que juntan múltiples caspasas en un agregado, en este agregado las caspasas se activan entre si mediante una pequeña actividad de proteasa basal; en unos momentos esta caspasas activas desencadenan la cascada de activación amplificando la señal de muerte. Las señales de muerte pueden originarse a dos niveles: en algunas células se puede inducir apoptosis presentando el ligando de Fas en su membrana, el cual se une a un receptor de muerte (Fas) en la superficie celular de la célula blanco, el agregado de Fas y su ligando recluta a los adaptadores que unen y activan a la procaspasa 8. La célula también en respuesta a daño o estrés puede activar la apoptosis, por ejemplo un daño severo al DNA puede inducirla mediante la p53, la cual activa la transcripción de genes que codifican para proteínas que promueven la liberación del citocromo C de la mitocondria, en el citoplasma se une al factor promotor de la apoptosis 1 (Apaf1) el cual agrega y activa a la procaspasa (Alberts, et al. 2002) (Fig. 13).

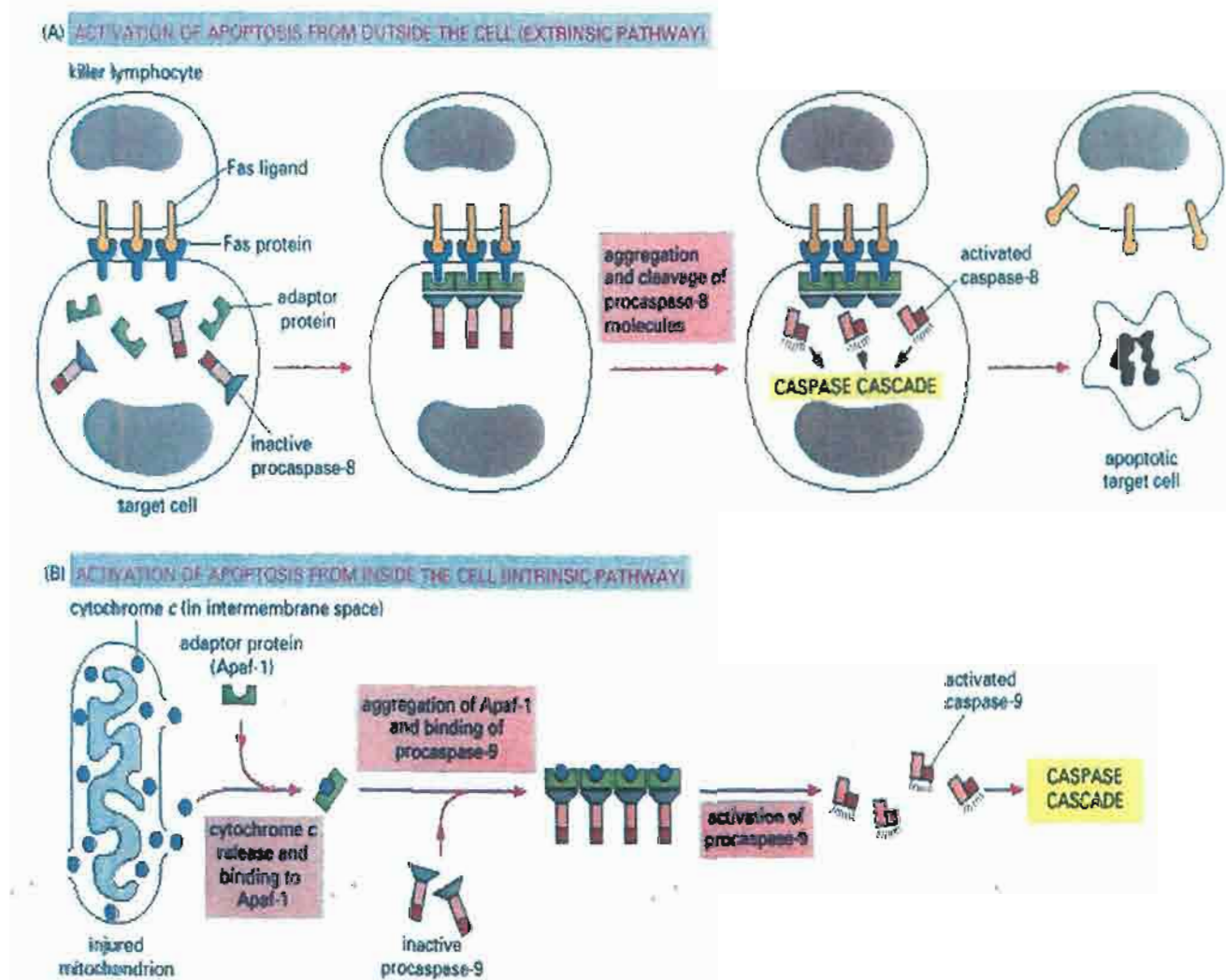


Fig. 13 Alberts, et al. 2002: Activación de la apoptosis desde el interior de la célula.

Se considera a la apoptosis como un mecanismo fisiológico de muerte (inherente al desarrollo celular), que se desencadena por diversas señales, las cuales pueden ser fisiológicas, o por estimulaciones exógenas ambientales. Estas señales pueden actuar sobre receptores de superficie y causar la activación en cascada de proteínas citoplasmáticas; ello trae como resultado la activación de un programa genético que conduce, generalmente, a la nucleólisis por la acción de las endonucleasas (Silvestri et al., 1995). Este mecanismo de muerte celular interviene en importantes fenómenos fisiológicos como: embriogénesis, mantenimiento de la homeostasia, renovación tisular y desarrollo y funcionamiento del sistema inmunitario (Onishi y Kizaki, 1994).

Los trastornos en la regulación de la apoptosis por diferentes vías, están presentes en la etiopatogenia de diversas enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas, y también se sugiere que participan en el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) (Ameisen, 1992; Onishi y Kizaki, 1994).

Debido a que la apoptosis puede considerarse como un proceso de eliminación de células defectuosas, la desregulación de los genes que codifican las proteínas relacionadas con la apoptosis, puede ser la causa del desarrollo de diversos tumores (Korsmeyer, 1992).

1.1.11.1.- RECEPTORES DE MEMBRANA CELULAR QUE MEDIAN APOPTOSIS

Un avance importante para la investigación de la apoptosis se logró cuando se indentificó un antígeno (Ag) de membrana celular capaz de inducir señales de apoptosis. Este receptor se denominó Fas o Apo-1, cluster de diferenciación 95 (CD95), y es una proteína transmembrana tipo II glicosilada de aproximadamente 43 kD que se expresa constitutivamente en gran variedad de tejidos normales y líneas tumorales (Tucek-Scabo et al., 1996).

El interés en este receptor aumentó cuando se demostró, en modelos murinos, que las mutaciones en el gen que codifica a este receptor, se relacionan con trastornos linfoproliferativos por la incapacidad de producir apoptosis (Clement y Stamenkovic, 1994).

El Fas/Apo-1 es miembro de la superfamilia de los Factores de Necrosis Tumoral (TNF), entre los que se encuentran los Receptores TNF tipo I y II, el receptor del factor de crecimiento neuronal (NGF), CD40 y CD27 (Itoh et al., 1991).

El ligando del Fas/Apo-1 es una proteína de membrana tipo II de 40 kD miembro de la familia del TNF que está altamente expresado en linfocitos activados (Suda et al., 1993). La unión del Ag de membrana Fas/Apo-1 con su ligando y con anticuerpos antagonistas, es una de las vías de inicio de señales para la apoptosis (Cascino et al., 1994). Existe una relación estrecha entre la participación del ligando Fas y la citotoxicidad mediada por los linfocitos T CD8+, mecanismo efector de gran importancia en la respuesta inmune antitumoral (Kagi et al., 1994).

El papel de la interacción Fas/Apo-1 y su ligando en cáncer no está bien establecido; sin embargo, su papel en la apoptosis sugiere su participación como supresores del tumor. Por ejemplo, la inactivación de las señales vía Fas debido a la baja expresión de este Ag en la membrana, puede llevar a la célula a una supervivencia anormal y contribuir al desarrollo y progresión de malignidades (Owen-Schaub et al., 1995).

1.1.11.2.- MECANISMOS BIOQUÍMICOS DE LA APOPTOSIS

Las vías bioquímicas involucradas en la apoptosis se encuentran actualmente en investigación. Se conoce que los linfocitos y la mayoría de las células nucleadas experimentan ruptura internucleosomal del DNA mediante endonucleasas Ca^{2+} Mg^{2+} dependiente, entre las que se encuentran la NUC-18, la DNAsa I y la DNAsa II (Martín, 1993).

Sin embargo, existen múltiples evidencias de apoptosis en células enucleadas, por tanto el mecanismo apoptótico puede no interesar al núcleo. Ciertos experimentos realizados en células enucleadas de nematodos que sufren apoptosis, han evidenciado la existencia de más de una vía de apoptosis, donde los cambios citoplasmáticos pueden ser decisivos. En esta especie se han definido varios genes que codifican proteínas citoplasmáticas relacionadas con la apoptosis, como la Ced-3 (ICE-enzima convertidora de IL1 b), Ced-4 y la Ced-9. En los mamíferos existe la proteasa "ICE like" (tipo hielo) que forma una familia de proteasas suicidas y es homóloga a la proteína Ced-3 de nematodos, también se observa homología entre los genes Ced-9 nematodos y bcl-2 de mamíferos, ambos inhibidores de la apoptosis (Martín, 1993; Smith et al., 1995).

1.1.11.3.- GENES INVOLUCRADOS EN LA APOPTOSIS FAMILIA DE GENES bcl-2

El bcl-2 (B cell leukemia/lymphoma 2 genes) fue el primer proto-oncogen detectado y fue asociado con procesos malignos de las células B. Durante la maduración de las células B puede ocurrir una traslocación cromosomal 14,18 en el gen bcl-2; ello provoca un aumento en la expresión de la proteína citoplasmática Bcl-2, que origina inhibición de la apoptosis en células B y da por resultado la supervivencia de la célula transformada (Reap et al., 1995). Está demostrado que la sobreexpresión del gen bcl-2 en linformas inducidos experimentalmente, se asocia con la proliferación neoplásica por los efectos inhibitorios de Bcl-2 sobre las vías de apoptosis (Munn et al., 1995). Este gen facilita el aumento de la supervivencia de la célula transformada y de este modo aumenta la posibilidad de futuras aberraciones genéticas que pueden conducir a la progresión maligna (Oltvai et al., 1993; Binder et al., 1995). La expresión de este gen en algunos tipos de cáncer es un marcador de mal pronóstico (Osborne y Schwartz, 1994).

El gen bcl-2 forma parte de una familia de genes que intervienen en la regulación de la supervivencia de la célula. Los miembros de la familia Bcl-2 están integrados por: Bcl-2, Bax, Bad, Bcl-X1, Bcl-Xs, Mcl-1. El destino de una célula de morir o sobrevivir está determinado por las diferencias en la expresión de estas proteínas, actuando algunas como promotoras y otras como inhibidoras de las señales de apoptosis (Boise y González-García, 1993; Boise et al., 1995).

La figura 14 muestra la regulación de la apoptosis por la familia Bcl-2. Debe observarse como el heterodímero Bcl-2Bax y la variante Bcl-X1 tienen efecto inhibitorio de la muerte celular, al impedir la acción de las proteasas cisteínas que median señales de apoptosis. Sin embargo, la formación de homodímeros Bax-Bax, así

como elevados niveles de Bax o Bcl-Xs, pueden favorecer la muerte programada de la célula (Cory et al., 1995; Bose et al., 1995).

Es importante destacar que Bcl-2 no confiere protección a la célula contra la apoptosis, ni en la selección negativa de células autorreactivas del timo, ni en los mecanismos citotóxicos de los linfocitos T citotóxicos (CTL). Tampoco se aprecia su efecto protector sobre las células B inmaduras que sufren apoptosis por entrecruzamiento IgM ni en la activación de la célula vía receptor Fas/TNF (Osborne y Schwartz, 1994; Cory, 1995).

El bcl-2 se expresa de manera importante durante estadios muy tempranos de la diferenciación de células B y T, y también está altamente expresado en la etapa de diferenciación final de los linfocitos; es por ello que las células en estadios intermedios de desarrollo son más susceptibles a la muerte celular (Cory, 1995).

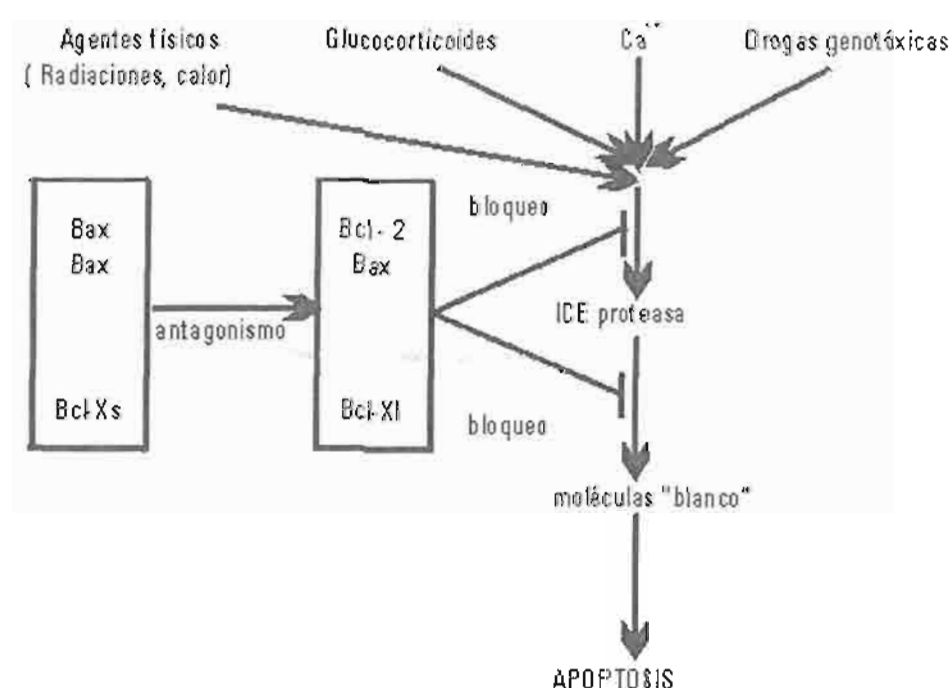


Fig. 14 Regulación de la apoptosis por la familia Bcl-2.

1.1.11.4.- OTROS GENES EN APOPTOSIS

Es conocido que ciertos oncogenes y genes supresores de tumor influyen en el mecanismo de muerte celular programada; tal es el caso de los genes c-myc y nur-77, (Osborne y Schwartz, 1994; Núñez et al., 1994) que a pesar de estar asociados con la progresión del ciclo celular participan en la inducción de apoptosis en algunas células, también se encuentra el gen bcl-2 que como ya ha sido descrito, bloquea la apoptosis cuando es sobreexpresado (Munn et al., 1995) y el gen p53, cuyo requerimiento se produce en casos de daño genómico (Osborne y Schwartz, 1994). La expresión de estos genes puede inducir a algunos tipos de cáncer a la apoptosis. Esto sugiere que la muerte celular programada es un mecanismo de defensa contra la transformación maligna (Núñez y Clarke, 1994).

El gen p53 ha sido llamado guardián del genoma por ser el encargado de bloquear la división celular cuando las células han sufrido daño en su material genético. Este bloqueo lo lleva a cabo deteniendo las células en la fase G1 del ciclo celular, con el objetivo de que se produzca la reparación del DNA antes de que se replique (Cohen, 1993; Meyn, 1996). Este gen mantiene la integridad del genoma ya que estimula la apoptosis en las células en las que el daño en el DNA ha sido sustancial (Tanaka et al., 1996). En diversos tipos celulares incluyendo los linfocitos, la sobreexpresión de p53 conduce directamente a la apoptosis (Cory, 1995).

La pérdida de la función normal del gen p53 puede conducir al desarrollo de neoplasias malignas; de hecho son muy frecuentes las alteraciones en este gen en una variedad de cánceres humanos (más del 50 % de los tumores humanos están asociados a mutaciones en p53) (Cory, 1995; Meyn et al., 1996). Hay evidencias que hacen pensar que el alto riesgo de la transformación maligna en ausencia de p53 funcional, probablemente origina una oportunidad reducida de reparar el DNA y una incapacidad de eliminar por apoptosis la célula dañada no reparada. Aunque es desconocida la base real de la apoptosis inducida por este gen (Ashwell et al., 1994).

Los timocitos de ratón que pierden copias funcionales del p53 son incapaces de desarrollar apoptosis luego de ser irradiados; estas células responden normalmente a glucocorticoides y a señales a través del receptor (Ashwell et al., 1994).

Se ha evidenciado que los genes involucrados en una vía de apoptosis no necesariamente juegan una importante función en otra vía. Así por ejemplo *nur77* se requiere para la apoptosis mediada por el receptor de células T (TCR), no siendo importante en la muerte celular por glucocorticoides o radiación ionizante. A pesar de esto, se ha observado en ratones deficientes de *nur77*, muerte celular mediada por el receptor, sugiriéndose que, o bien este gen no es requerido *in vivo* para la apoptosis, o existe un gen estrechamente relacionado con él que puede compensar su deficiencia (Osborne, 1996).

Estudios anteriores sugieren la influencia de la expresión de *nur77* en la proliferación o la diferenciación celular (Osborne y Schwartz, 1994).

El producto de *nur77* es una proteína que pertenece a la familia del receptor nuclear de hormonas esteroideas y su efecto en la apoptosis está dado porque actúa como un factor de transcripción que regula la expresión de genes involucrados en la muerte celular (Núñez et al., 1994).

Otro regulador fisiológico del ciclo celular que participa en la apoptosis es la proteína Myc, que es producto del proto-oncogen *c-myc*. La sobreexpresión del gen *c-myc* pudiera resultar en mitosis o apoptosis en dependencia de la disponibilidad de otros factores que estimulan el crecimiento celular (Cohen, 1993). De esta forma la expresión incrementada de Bcl-2 en presencia de un aumento de *c-myc* provoca una inhibición de la apoptosis mediada por *c-myc*, lo que explica la cooperación que se produce entre ambos genes en el origen de las neoplasias (Cory, 1995). Además del papel que juega la apoptosis en el origen del cáncer, su modulación también pudiera influir en el tratamiento de esta enfermedad (Núñez y Clarke, 1994).

1.1.11.5.- PAPEL DE LA APOPTOSIS EN EL SISTEMA INMUNITARIO

La muerte celular programada es muy importante para el desarrollo y funcionamiento del sistema inmunitario, debido a que interviene en los eventos de formación del repertorio de células T y B, en los mecanismos de tolerancia central y periférica, en la eliminación de células autorreactivas, en el establecimiento de la memoria inmunológica y en los mecanismos citolíticos de células asesinas naturales y linfocitos T citotóxicos (Osborne, 1996).

Es conocido que el 95 % de los timocitos son eliminados en el timo por mecanismos de apoptosis, proceso denominado selección negativa (delección clonal), el cual elimina la existencia de clones T autorreactivos (Osborne, 1996; Schwartz, 1993).

También en la médula ósea existe un proceso similar de delección de clones B, autorreactivos en el estadio B inmaduro por entrecruzamiento de la inmunoglobulina de superficie en ausencia de señales coestimuladoras (Schwartz, 1993). No obstante, la apoptosis no se restringe a las células inmaduras.

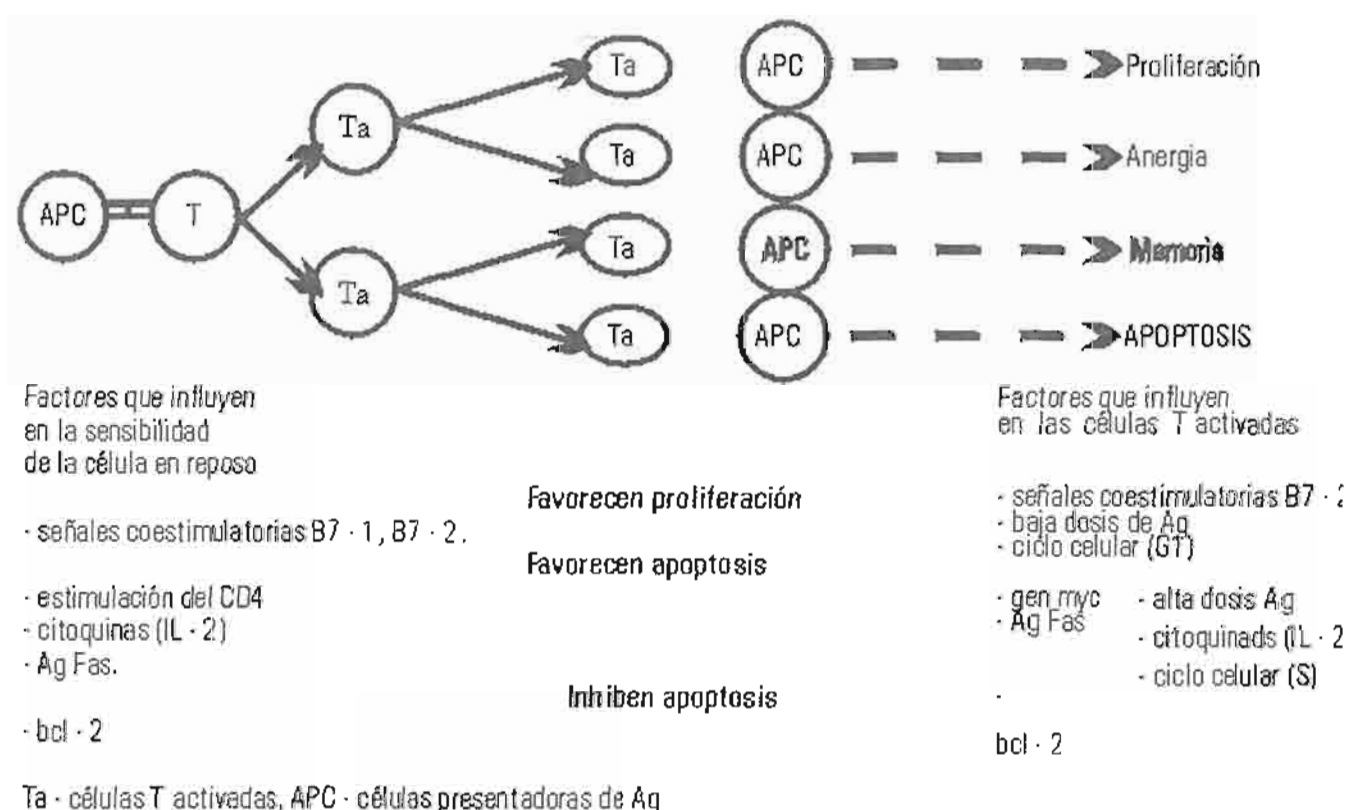


Fig. 15. Factores que regulan la ruta de las células T activadas, después del reencuentro con el Ag.

También los linfocitos T maduros, bajo ciertas condiciones, pueden sufrir apoptosis, lo que corrobora su papel inmunorregulador. Entre los factores que pueden inducir apoptosis en células maduras están: los glucocorticoides y las radiaciones gamma, la estimulación del complejo TCR/CD3 por anticuerpos monoclonales, (Osborne y Schwartz, 1994) Ags nominales y superantígenos y la estimulación de los receptores CD2, Fas/Apo-1 y TNF (Itoh et al., 1991; Cascino et al., 1994). Se ha demostrado que la sensibilidad para lograr la apoptosis es más lenta en células maduras y requiere previa activación. La ruta que siguen los linfocitos T al ser estimulados depende de una serie de elementos que determinan si la célula prolifera, o si muere por apoptosis. La figura 15 muestra los diversos factores que influyen en dicha decisión (Boise et al., 1995; Strasser, 1995).

1.1.12.- EL CITOSOL

Toda la porción citoplasmática que carece de estructura y constituye la parte líquida del citoplasma, recibe el nombre de citosol por su aspecto fluido. En él se encuentran las moléculas necesarias para el mantenimiento celular. El citosol no es un organelo, ni puede considerarse como tal; sin embargo, se debe tener presente que no se trata de un simple ambiente inerte que sirva sólo de asiento a los organelos y otras estructuras celulares. El citosol es en primer lugar el componente más extenso de la célula, y contiene una cantidad enorme de enzimas, muchas de las cuales funcionan de manera concertada para constituir vías metabólicas. Por otra parte, el citosol es el paso obligado en el camino de tantos miles de moléculas que van de uno a otro componente de la célula (Harris, 1999). Entre los caminos metabólicos que tienen lugar en el citosol se encuentra la glucólisis, que es una serie larga de reacciones que convierten a la glucosa en ácido pirúvico o láctico en algunas células, o en alcohol etílico en otras, por ejemplo, en las levaduras. Es ahí donde tienen lugar los cambios necesarios para llevar a muchas moléculas o sus partes hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Cuando las proteínas, o parte de sus componentes se convierten en azúcares, como sucede durante periodos de ayuno prolongados, utilizan gran parte de la misma vía en un proceso que se llama gluconeogénesis, que también tiene lugar en el citosol. La síntesis de los ácidos grasos sigue un camino que está organizado como un complejo multienzimático (supramacromolecular) y que se encuentra en el citosol. Las fases preparatorias para utilizar los aminoácidos en la síntesis de las proteínas se realizan en el citosol. Estos son sólo unos cuantos de los cientos de caminos metabólicos que siguen para producir los varios miles de moléculas que constituyen a las células (Horiike et al., 2001).

1.2.- TEORIA CELULAR

1.2.1.- GENERALIDADES

La teoría celular constituye una de las ideas o conceptos unificadores fundamentales en el estudio de las ciencias biológicas. Ha actuado como un paradigma general en la comprensión de la construcción de los tejidos biológicos y los organismos vivos. Para el descubrimiento de las células se necesitó de un nuevo instrumento óptico amplificador, el Microscopio y en el desarrollo intelectual de la teoría se refleja la aplicación de un enfoque reduccionista

(reduccionismo, la idea de que la complejidad de una estructura se puede reducir al comportamiento de elementos más simples que la componen) al estudio de la organización estructural y funcional de los seres vivos. La teoría celular cabría inscribirla dentro de un concepto aún más unificador en biología, la existencia de una gran modularidad (las estructuras más complejas se forman a partir de la unión de módulos más simples) que caracteriza la jerarquía de los niveles de organización y funcionamiento característica de muchos de los elementos estructurales (e.g. proteínas, ácidos nucleicos, etc.) que componen los seres vivos (Harris, 1999).

Los conceptos de materia viva y célula están estrechamente ligados. La materia viva se distingue de la no viva por su capacidad para metabolizar y autoperpetuarse, además de contar con las estructuras que hacen posible la ocurrencia de estas dos funciones; si la materia metaboliza y se autoperpetúa por sí misma, se dice que está viva (Norbert, et al., 1996).

La célula es el nivel de organización de la materia más pequeño que tiene la capacidad para metabolizar y autoperpetuarse, por lo tanto, tiene vida y es la responsable de las características vitales de los organismos. En la célula ocurren todas las reacciones químicas que nos ayudan a mantenernos como individuos y como especie. Estas reacciones hacen posible la fabricación de nuevos materiales para crecer, reproducirse, repararse y autorregularse; asimismo, produce la energía necesaria para que esto suceda. Todos los seres vivos están formados por células, los organismos unicelulares son los que poseen una sola célula, mientras que los pluricelulares poseen un número mayor de ellas (Horiike et al., 2001).

Si se considera lo anterior, se puede decir que la célula es nuestra unidad estructural, es la unidad de función y es la unidad de origen; esto, finalmente es lo que postula la Teoría celular moderna. Llegar a estas conclusiones no fue trabajo fácil, se requirió de poco más de doscientos años y el esfuerzo de muchos investigadores para lograrlo. Quienes postularon la Teoría celular formaron parte de este grupo y entre ellos se puede mencionar a Robert Hooke, René Dutrochet, Theodor Schwann, Mathias Schleiden y Rudolph Virchow. Es importante hacer notar que el estudio de la célula fue posible gracias al microscopio, el cual se inventó entre los años 1550 y 1590; algunos dicen que lo inventó Giovanni Farber en 1550, mientras que otros opinan que lo hizo Zaccharias Jannsen hacia 1590 (Horiike et al., 2001).

Robert Hooke (1665), primero en utilizar la palabra "célula", hacía observaciones microscópicas de un trozo de corcho. Hooke no vio células tal y como se conocen actualmente, él observó que el corcho estaba formado por una serie de celdillas, ordenadas de manera semejante a las celdas de una colmena; para referirse a cada una de estas celdas, él utiliza la palabra célula. René Dutrochet (1824) fue el primero en establecer que la célula era la unidad básica de la estructura, es decir, que todos los organismos están formados por células. Mathias Schleiden (1838), un botánico de origen alemán, llegaba a la conclusión de que todos los tejidos vegetales estaban formados por células. Mientras tanto, otro alemán, el zoólogo Theodor Schwann (1839) extendió las conclusiones de Schleiden (1838) hacia los animales y propuso una base celular para toda forma de vida. Finalmente, Rudolf Virchow (1858) al hacer estudios sobre citogénesis de los procesos cancerosos llega a la siguiente conclusión: "las células surgen de células preexistentes" o como lo decía en su axioma "omni cellula e cellula". Tanto Schleiden (1838) y como Schwann (1839) afirmaban que el organismo era un agregado según ciertas leyes de otros seres de orden inferior; contra la opinión vitalista de la unidad de la vida en el cuerpo orgánico y contra la fuerza vital unitaria. Schleiden (1838) aducía que la vida es el resultado de la colaboración de muchas células. Schleiden (1838), botánico, y Schwann (1839),

zoólogo, estudiaron muchos tipos de tejidos en sus respectivos campos. Ambos llegaron a la conclusión de que:

La célula es la unidad estructural básica de todos los organismos. La célula constituye la unidad fundamental de los seres vivos. Todo organismo vivo está constituido por una o por una multitud de células. Este es el enunciado básico de la teoría celular. La Teoría Celular, tal como se le considera hoy, puede resumirse en cuatro proposiciones:

1. En principio, todos los organismos están compuestos de células.
2. En las células tienen lugar las reacciones metabólicas de organismo.
3. Las células provienen tan solo de otras células preexistentes.
4. Las células contienen el material hereditario.

Si se considera lo anterior, se puede decir que la célula es nuestra unidad estructural, ya que todos los seres vivos están formados por células; es la unidad de función, porque de ella depende nuestro funcionamiento como organismo y es la unidad de origen porque no se puede concebir a un organismo vivo si no esta presente al menos una célula. Por sus aportaciones, Theodor Schwann (1839 y Mathias Schleiden (1838) son considerados los fundadores de la Teoría Celular Moderna (Mazzarello, 1999).

1.2.2.- HISTORIA DE LA TEORÍA CELULAR

La teoría celular fue propuesta en la primera mitad del siglo XIX (1838-1839) por el botánico Jakob Schleiden (1804–1881), el zoólogo Theodor Schwann (1810–1882) y del patólogo alemán Rudolf Virchow (1821–1902). Sin embargo, el conjunto de observaciones y técnicas microscópicas que permitió la formulación de la misma tuvo un largo camino desde que en el siglo XVII Antoni van Leeuwenhoek (1632–1723), un apasionado científico amateur, aficionado que fabricaba sus propios microscopios simples (de una sola lente) de una calidad excepcional con el que pudo descubrir el fascinante y hasta entonces totalmente ignoto mundo de los microbios, entre ellos las bacterias y a los que él denominó animacules (Ledesma, 2000).

El nombre de célula se debe al científico británico Robert Hooke (1635–1702) que lo acuñó en después de que observara a través de su microscopio finas láminas de corcho, en la que observó la presencia de celdas o compartimentos que lo componían; en realidad observó las paredes celulares de las células vegetales muertas. Así, el término célula procede del latín *cella* o *cellulae* que quiere decir "pequeño compartimento" o celda pequeña. Su trabajo fue documentado en la monografía *Micrographia* escrito en 1665 (Harris, 1999).

En 1838, el botánico Matthias Jakob Schleiden (1804–1881) sugirió que cada elemento estructural de las plantas está compuesto de células o de sus productos. El zoólogo Theodor Schwann (1810–1882) al año siguiente hizo una propuesta similar en relación a los animales. Las partes elementales de todos los tejidos están formados por células y que hay un principio de desarrollo de las partes elementales de un organismo...y este principio está en la formación de las células, ambos científicos pues fueron los artífices de teoría celular. El patólogo alemán Rudolf Virchow (1821–1902) y Albert Kölliker (1817–1905) demostraron que las células proceden por escisión de otras células pre-existentes. El aforismo de Virchow *omnis cellula e cellula* (toda célula procede de otra célula) recoge esa última observación (Harris, 1999).

Algunos eventos en biología celular como línea de tiempo: 1639 Robert Hooke observa células de corcho con un microscopio primitivo; 1680 A. Leeuwenhoek (1632-

1702) descubre espermatozoides en el semen; 1688 Redi publica su trabajo sobre la generación espontánea; 1839 Johannes Müller efectúa investigaciones microscópicas e histológicas; 1839 Jacob Henle realiza una descripción general de la epidermis y el epitelio; 1839 Schleiden y Schwann proponen la Teoría Celular; 1839 Robert Remak (1815-1865) descubrimiento de las células ganglionares del corazón humano; 1841 Albert Koelliker (1817-1905) descubre que cada espermatozoide es una célula, la célula germinal masculina; 1852 Robert Remak demostró que el óvulo es una célula; 1855 Rudolf Virchow afirma que todas las células provienen de células; 1873 Camillo Golgi da a conocer su procedimiento de tinción de las células nerviosas y 1888 Santiago Ramón y Cajal modifica el método de tinción de Golgi y logra esclarecer todas las estructuras del sistema nervioso.

1.2.3.- EL IMPACTO DE LA TEORIA CELULAR EN BIOLOGIA MOLECULAR

Una de las numerosas contribuciones unificadoras de la teoría celular consistió en dar un nuevo significado a los términos óvulo y semen, que hasta entonces habían sido conceptos bastante confusos. Resulta curioso que hasta 1880, aproximadamente, siguiera existiendo mucha incertidumbre acerca del significado de la fecundación. Para los físicos (el fisicismo era la insistencia y creencia en ciertos principios dominantes en la física clásica) la fecundación no era más que el impulso o señal que iniciaba la segmentación de la célula huevo. Así interpretaba la fecundación Miescher (1874), el descubridor del ADN. Con el tiempo, los citólogos como Hertwig y Van Beneden demostraron que el espermatozoide aporta al huevo mucho más que una simple orden de iniciar la primera segmentación; también aporta el núcleo de la célula germinal (gameto) masculina. Este núcleo con su dotación haploide de cromosomas penetra en el óvulo y se suma a la dotación haploide del mismo formando el núcleo diploide del cigoto. Así, la fecundación restaura la diploidía y combina en la descendencia genes del padre y de la madre (Mayr, 1998).

1.3.- CELULAS MADRE

El avance en las investigaciones sobre células madre está ampliando el campo del conocimiento acerca de cómo un organismo se desarrolla desde una simple célula, hasta de qué modo células sanas reemplazan a células dañadas. Esta promisorio área de la ciencia está impulsando a los científicos a investigar las posibilidades de aplicar terapias celulares para tratar enfermedades, las cuales son referidas como medicina reparativa o medicina regenerativa (Nombela, 2007). La de células madre es una de las áreas más fascinantes de la biología actual, pero como tantos otros campos en desarrollo de la ciencia, las investigaciones en células madre generan tantas preguntas como nuevos descubrimientos.

Las células madre tienen dos características importantes que las distinguen de otros tipos de células. La primera de ellas es que son células no especializadas que se renuevan ilimitadamente. La segunda es que bajo ciertas condiciones fisiológicas o experimentales, se las puede inducir a que se conviertan en células con funciones especiales tales como células musculares cardíacas o células de páncreas que produzcan insulina. Los científicos trabajan sobre todo con dos clases de células madre de animales y de seres humanos: células madre embrionarias y células madre adultas, que poseen diversas funciones y características.

Se ha descubierto diversas maneras de obtener o aislar las células madre de embriones tempranos del ratón hace más de 20 años. Muchos años de estudio detallado de la biología de las células madre del ratón condujeron al descubrimiento, en 1998, de cómo aislar las células madre de embriones humanos y hacerlas crecer en el laboratorio. Éstas se denominan células madre embrionarias humanas. Los embriones usados en estos estudios fueron creados con el propósito de tratar la infertilidad mediante procedimientos de fertilización in Vitro y cuando ya no fueron necesarios para ello, fueron donados para la investigación con el consentimiento informado del donante. Las células madre son importantes para los organismos vivos por muchas razones. En algunos tejidos adultos, tales como la médula ósea, músculo, y cerebro, pequeñas poblaciones definidas de células madre adultas pueden migrar y reemplazar a las células que se pierden en diferentes órganos como resultado de un desgaste normal, por lesiones o enfermedades.

Se considera que las células madre podrían en el futuro, convertirse en la base para el tratamiento de enfermedades tales como cáncer, Parkinson, diabetes y cardiovasculares. Pero es necesario estudiar las células madre en sus laboratorios para comprender más sus características esenciales y qué es lo que las hace diferentes de otros tipos especializados de células.

En humanos se conoce desde hace años, al igual que en ratones, la célula madre hematopoyética de adultos, que reside en la médula ósea y que da origen a todas las líneas de células sanguíneas e inmunes. Aunque se conocen desde hace tiempo células madre en tejidos que, como la sangre o la epidermis, presentan gran tasa de proliferación, solo recientemente se han descubierto células madre en órganos que normalmente tienen una baja tasa de renovación, como es el caso del cerebro.

Así pues, la novedad ha consistido en reconocer la existencia de células madre pluripotentes en otros tejidos y órganos, y aún más interesante, que algunas de ellas presentan la suficiente flexibilidad como para generar células especializadas de otros linajes. Esto ha supuesto una sorpresa alentadora, ya que aumenta la perspectiva de obtener a largo y medio plazo terapias celulares, sin los problemas éticos asociados a destruir embriones para obtener células madre (Frederiksen et al., 1988).

Si los científicos lograran un mayor conocimiento sobre las células madre podría llegar a ser posible su utilización terapéutica, las células madre embrionarias humanas se han estudiado desde 1998. Por lo tanto, para desarrollar tales tratamientos los científicos están estudiando de manera intensiva las características fundamentales de las células madre, que abarcan:

1. determinar de manera precisa porqué y mediante que mecanismos biológicos las células madre siguen siendo no especializadas y auto-renovables por muchos años; y
2. identificar cuáles son las señales que hacen que las células madre se conviertan en células especializadas.

1.3.1.- DEFINICIÓN Y PROPIEDADES

Las células madre o células troncales pueden definirse de forma general por sus dos principales propiedades: su capacidad de auto-replicarse indefinidamente y su capacidad de diferenciarse hacia múltiples tipos de célula de un organismo. Es muy difícil, sin embargo, establecer una definición exacta y sin ambigüedades que contenga todos los tipos de células madre que se conocen hasta el momento.

Una célula madre es una célula indiferenciada, inmadura, capaz de dividirse simétrica o asimétricamente para dar lugar a varias células de las cuales alguna debe de ser igual a su progenitora. Una célula madre puede, en principio y en las condiciones

adecuadas, dividirse indefinidamente en el tiempo, manteniendo siempre una población estable de células madre idénticas. Bajo las condiciones apropiadas y recibiendo los estímulos correctos, las células madre pueden diferenciarse hacia varios, muchos o todos los tipos de células especializadas de un organismo maduro. Dependiendo del potencial de la célula madre (Figura 16), ésta puede clasificarse en totipotente si es capaz de generar todas las células del embrión y del tejido extraembrionario, pluripotente si puede crear todos los tipos celulares que formaran el embrión, multipotente si sólo es capaz de generar los tipos celulares del tejido de donde proviene o bien unipotente si tan solo puede dar lugar a un único tipo celular. Su potencialidad dependerá de su origen, es decir, del estadio del desarrollo y de la zona del organismo donde resida (Lovell-Badge 2001; McKay 2000; Temple 2001).

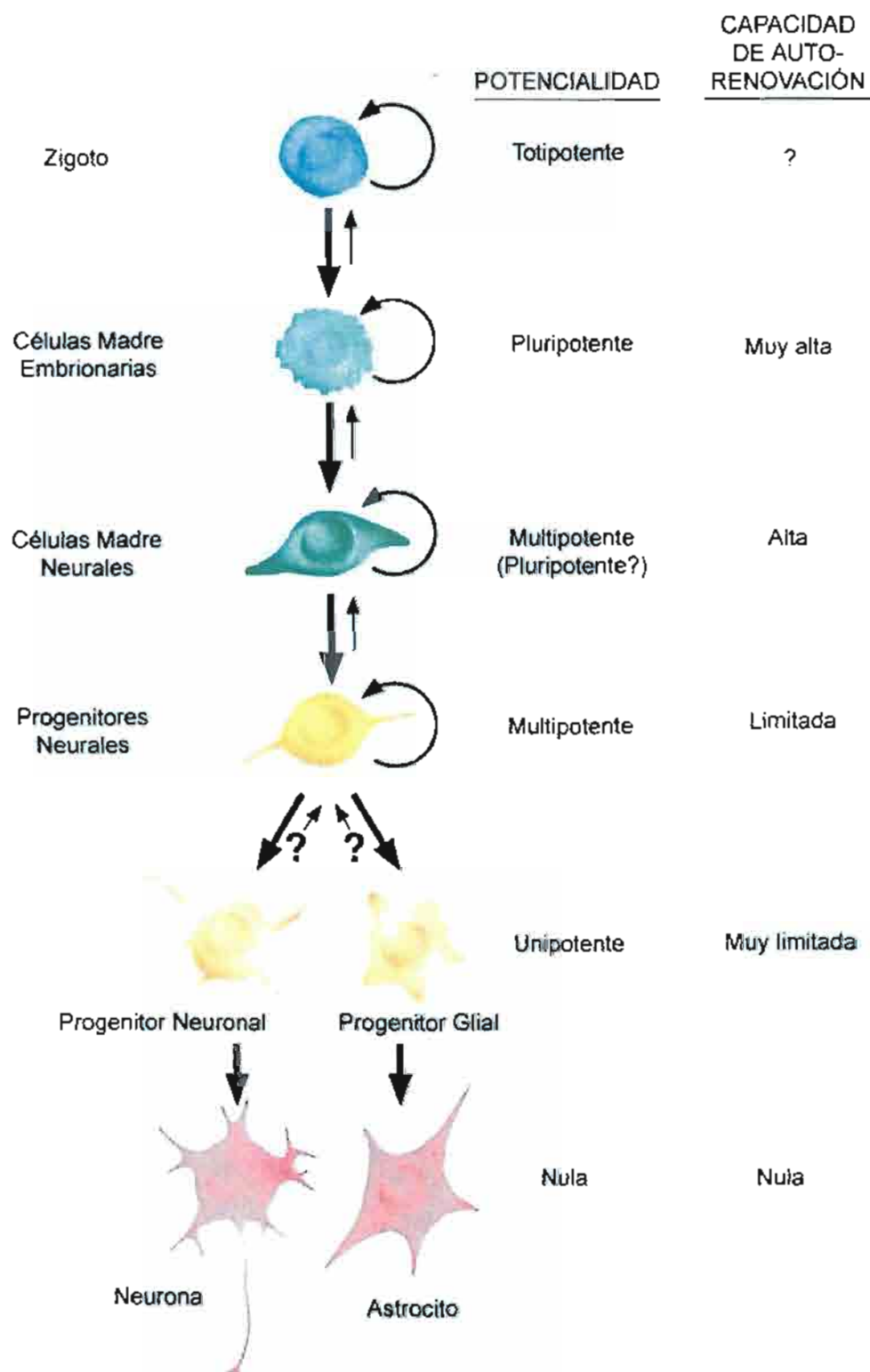


Figura 16. Propiedades de auto-renovación y potencialidad de los diferentes tipos de células madre que podemos encontrar en el proceso de desarrollo, desde un cigoto hasta la formación del tejido nervioso maduro. A medida que se avanza en el desarrollo se van restringiendo estas propiedades y disminuye el número de células que las conservan. Modificado de Gage 2000.

Actualmente se sabe que existen células madre en todas las etapas del desarrollo de un organismo, desde el inicio hasta su muerte. La célula madre por excelencia es el óvulo fecundado o cigoto. Es totipotente y a partir de ella se desarrollan todas las células que darán lugar al organismo, tanto las células somáticas como las germinales, e incluidas las células extraembrionarias que formarán la placenta. A medida que el embrión va desarrollándose, las células madre van dividiéndose, migrando y diferenciándose en todos los tipos celulares que formarán los distintos órganos. Esto lo harán siguiendo una compleja secuencia de expresiones génicas orquestada por precisos programas genéticos y regulados por la información de las células vecinas, en un patrón espacio-temporal muy definido. En este proceso las células van especializándose cada vez más y su potencialidad va reduciéndose, desde la pluripotencialidad a la multipotencialidad y así hasta la unipotencialidad (Figura 16). En primer lugar, por ejemplo, las células madre son confinadas a una de las tres capas germinales del embrión: endodermo, mesodermo o ectodermo. A partir de aquí irán especificándose a un sistema, órgano o tejido determinado, hasta llegar a su fenotipo, posición, morfología y función final (Shamblott, et al., 1998).

Es importante tener en cuenta que la propia definición de célula madre o su clasificación en subtipos es puramente funcional y no morfológica. Atiende a propiedades observadas experimentalmente y bajo condiciones muy particulares. Estas propiedades pueden ser diferentes dependiendo de si se considera a la célula en su entorno natural *in vivo*, o si está siendo cultivada *in vitro*, o si ha sido transplantada otra vez *in vivo* en emplazamientos homotópicos o ectópicos. Uno de los principales problemas en la investigación en células madre, tanto sobre sus orígenes, localizaciones y propiedades biológicas, como sobre su manipulación para el desarrollo de terapias, es la falta de marcadores específicos que nos indiquen inequívocamente si una célula es una célula madre o qué tipo de célula madre es (Shamblott, et al., 1998).

1.3.2.- TIPOS Y ORÍGENES.

A lo largo de todo el proceso de desarrollo de un organismo se puede extraer diferentes tipos de células madre que se cultivan *in Vitro*. Dependiendo de su origen, se obtendrán unas células con diferentes propiedades. Como regla general se puede establecer que cuanto más primitiva sea la fuente de células madre más potencialidad en cuanto a proliferación y diferenciación tendrán esas células. Cuanto más avanzado sea su origen, se obtendrán células con capacidades más restringidas (Gage 2000; Temple 2001).

A continuación se detallan algunos de los tipos de células madre que se están investigando en la actualidad en cuanto a sus propiedades biológicas y su potencial como herramientas terapéuticas para enfermedades de leucemias (Figura 17).

1.3.3.- CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS.

Las células madre embrionarias (ESC, del inglés *Embryonic Stem Cells*) son células aisladas de la masa celular interna de un embrión pre-implantacional en el estado inicial de blastocisto (Figura 17), cuando está formado por tan sólo 100-200 células (día 4-5 de gestación en humanos o día 4 en ratones). Son células

pluripotenciales, con capacidad de generar todos los tipos celulares de un organismo, incluidas las células germinales, aunque no pueden dar lugar a las células de la placenta.

Las ESC de ratón fueron aisladas y cultivadas por primera vez en 1981 (Evans y Kaufman 1981; Martin 1981). Desde entonces y sobretodo a partir del aislamiento de las ESC humanas en 1998 (Thomson et al., 1998), este tipo de células ha sido intensamente investigado para conocer sus propiedades biológicas y su potencial para el desarrollo de terapias celulares. Han demostrado una gran capacidad de proliferación y auto-renovación *in Vitro*. Esto las hace especialmente interesantes para obtener grandes cantidades de células útiles para transplantar.

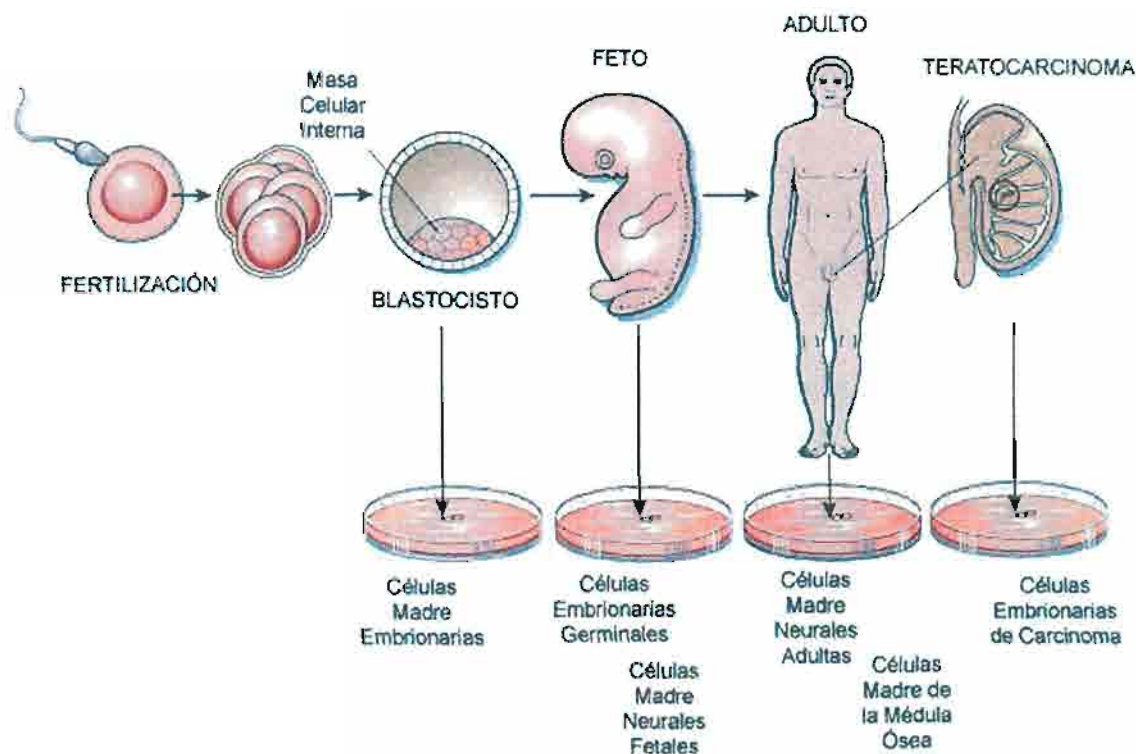


Fig. 17. Tipos de células madre según su origen. Células madre con diferentes propiedades han sido extraídas de diferentes orígenes, cultivadas y analizadas para su potencial neurogénico. Modificado de Donovan y Gearhart 2001.

Por el contrario, también presentan un elevado riesgo de formación de teratomas si son transplantadas en estado proliferativo, lo que obliga a una máxima cautela antes de ser utilizadas en ensayos de terapia celular para pacientes (Olsson et al., 1997; Bjorklund et al., 2002).

Las ESC pueden cultivarse indefinidamente sobre una capa de células soporte o bien en flotación, en forma de cuerpos embrioides. Presentan un cariotipo normal que parece ser estable a lo largo del cultivo o después de manipulaciones, aunque recientemente se han descrito la aparición de ciertas anomalías (Draper et al., 2004). Se ha demostrado su gran potencial de diferenciación hacia todos los fenotipos posibles, tanto *in vitro* como en transplantes ectópicos o en estudios de animales quiméricos (Donovan y Gearhart 2001; Lovell-Badge 2001).

Debido a que las definiciones y clasificaciones de las células madre se basan todavía en pruebas funcionales, hay muchas características de las ESC humanas que no se conocen en detalle. Para determinar la potencialidad de unas células se utilizan tres

tipos de experimentos: la diferenciación espontánea o inducida en cultivo, el implante en ratones inmunodeficientes para observar la aparición de tumores, o bien la inyección de las células en blastocistos que se dejan desarrollar hasta la formación de organismos quiméricos. No se puede asegurar categóricamente, por ejemplo, que las ESC humanas posean el mismo potencial que las ESC murinas y que implantadas en un embrión huésped sean capaces de generar todos los tejidos de un organismo adulto, incluidos los gametos, puesto que este experimento, por razones obvias, no se ha llevado a cabo.

1.3.4.- CÉLULAS EMBRIONARIAS GERMINALES.

Las células madre embrionarias, como su nombre lo indica, derivan de embriones. Específicamente, las células madre embrionarias provienen de los embriones que se obtienen de los huevos que han sido fertilizados in vitro en una clínica de fertilización in vitro y después donados para propósitos de investigación con el consentimiento informado de los donantes. No derivan de los huevos fertilizados en el cuerpo de una mujer. Los embriones de los cuales derivan las células madre embrionarias humanas tienen entre cuatro y cinco días de vida y son una bola hueca microscópica de células llamadas blastocitos. El blastocito incluye tres estructuras: el trofoblasto, que es la capa de células que rodea al blastocito; el blastocelo, que es la cavidad hueca dentro del blastocito; y la masa interna de la célula, que es un grupo de aproximadamente 30 células en un extremo del blastocelo (Shamblott et al., 1998).

La generación del crecimiento de las células en el laboratorio se conoce como cultivo de células. Las células madre embrionarias humanas son aisladas transfiriendo la masa interna de la célula a un plato de laboratorio que contenga un caldo nutriente conocido como medio de cultivo. Las células se dividen y se extienden por la superficie del plato. La superficie interna del plato de cultivo está cubierta normalmente con células embrionarias de piel de un ratón que han sido irradiadas para evitar su división. Esta capa protectora de células de ratón se llama capa del alimentador. Las células del ratón están ubicadas en el fondo del plato de cultivo con el fin de dar a las células embrionarias una superficie pegajosa a la cual se puedan unir. También, las células del alimentador lanzan los alimentos al medio de cultivo (Shamblott et al., 1998).

Recientemente, los científicos han comenzado a idear maneras de hacer crecer células madre embrionarias sin las células de alimentador del ratón. Esto es un adelanto científico significativo debido al riesgo de que los virus u otras macromoléculas de las células del ratón puedan ser transmitidos a las células humanas. A lo largo de varios días, las células de la masa interna de la célula proliferan y comienzan a apretarse en el plato de cultivo. Cuando esto ocurre, se quitan suavemente y se transfieren a varios platos de cultivo frescos. El proceso de volver a colocar las células en nuevos platos de cultivo se repite muchas veces y durante muchos meses, y este proceso se llama crear un subcultivo. Cada ciclo de creación de un subcultivo de células es denominado pasaje. Después de seis meses o más, las 30 células originarias de la masa interna de la célula producen millones de células madre embrionarias. Las células madre embrionarias que han proliferado en el cultivo por seis o más meses sin distinguir son pluripotentes se presentan genéticamente normales y se denominan líneas celulares provenientes de células madre embrionarias. Una vez que se establecen las variedades de células, o aún antes de esa etapa, pueden ser congeladas y enviadas a otros laboratorios para cultivo y experimentación adicionales (Kanatsu – Shinohara et al., 2004).

Las células madre embrionarias germinales (EGC, del inglés *Embryonic Germ Cells*) son células provenientes de embriones más desarrollados. Se aíslan de los

precusores germinales extraídos de los primordios de las gónadas de un embrión postimplantacional de 5-10 semanas de vida en humanos; Figura 17). Estas son las células que darán lugar, en el adulto, a los gametos. Son pluripotenciales, por lo que pueden generar todos los tipos de células, tanto somáticas como germinales, pero no extraembrionarias. Se han extraído EGC humanas de fetos abortados y han sido cultivadas *in vitro* (Shamblott et al., 1998). Presentan, al igual que las ESC, una gran capacidad de proliferación y de diferenciación, aunque sus propiedades son algo diferentes. A diferencia de las ESC, no son capaces de desarrollar teratomas después de su implante en ratones adultos inmunodeprimidos (Shamblott et al., 1998). Muy recientemente se ha demostrado que es posible extraer células madre pluripotenciales parecidas a las EGC, incluso de las gónadas de ratones recién nacidos (Kanatsu-Shinohara et al., 2004).

1.3.5.- CÉLULAS EMBRIONARIAS DE CARCINOMA.

Las células madre embrionarias de carcinoma (ECC, del inglés *Embryonic Carcinoma Cells*) son células que provienen de teratocarcinomas (Figura 17), tumores complejos derivados de las gónadas adultas con mezclas de células indiferenciadas y diferenciadas hacia cualquier tipo celular. Proceden del mismo tipo de células madre que las EGC, los precusores de las células germinales, pero en el estadio adulto (Kleinsmith y Pierce 1964; Stevens 1967a; Skakkebaek et al., 1987). Son células pluripotenciales. En cultivo se dividen indefinidamente y pueden diferenciarse hacia todos los tipos de células somáticas de las tres capas embrionarias, pero no pueden generar células germinales (Kleinsmith y Pierce 1964; Stevens 1967b; Martin y Evans 1974).

La propia biología de las células madre pluripotenciales empieza con los trabajos de Leroy Stevens (Stevens 1967a; Stevens 1967b) sobre células derivadas de estos tumores en ratón. Hacia mediados de la década de los 70s se propuso que células pluripotenciales como las ECC humanas podían servir para generar todo tipo de células, y desarrollar de este modo terapias de sustitución celular en enfermedades donde una población concreta de células haya desaparecido. Sin embargo, su cariotipo anormal y su procedencia tumoral instigaron a los investigadores a la búsqueda de otras fuentes de células pluripotenciales.

1.3.6.- CÉLULAS MADRE DE ORIGEN FETAL Y ADULTO.

Es posible aislar células que cumplan las dos condiciones básicas que las definen como células madre tanto de fetos en desarrollo como de un organismo adulto. Normalmente son consideradas como multipotenciales: pueden dar lugar solamente a todos los tipos celulares presentes en el propio tejido al que pertenecen. Se cree que estas células generan los llamados precusores o progenitores, que son a su vez, mucho más restringidos. Estos progenitores pueden dividirse, aunque no indefinidamente, y su potencial se limita ya a unos pocos tipos de célula maduras y especializadas (Temple, 2001).

Un ejemplo de este tipo de células multipotenciales son las células madre neurales (NSC, del inglés *Neural Stem Cells*). Las NSC pueden aislarse del cerebro en desarrollo o en el adulto (Figura 17), u obtenerse a partir de ESC. Pueden ser

expandidas en cultivo y son capaces de diferenciarse en los tres subtipos de células neurales: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos (Gage 2000; Temple 2001).

Las funciones principales de las células madre adultas en un organismo vivo son mantener y reparar el tejido en el que se encuentran. También se usa el término celular somática plazo madre en lugar de células madre de adultos, donde se refiere a las células somáticas del cuerpo (no las células germinales, espermatozoides o los óvulos). A diferencia de las células madre embrionarias, que son definidas por su origen (la masa celular interna del blastocisto). La investigación sobre células madre adultas ha generado un gran entusiasmo. Se han descubierto células madre adultas en muchos más tejidos de lo que se creía posible. Este hallazgo ha llevado a los investigadores y los clínicos a preguntarse si las células madre adultas podrían ser utilizados para trasplantes. De hecho, las células hematopoyéticas adultas, o que forman la sangre, las células madre de la médula ósea se han utilizado en los trasplantes de 40 años. Hay pruebas de que las células madre existen en el cerebro y el corazón. Si la diferenciación de las células madre adultas pueden ser controladas en el laboratorio, estas células pueden convertirse en la base de las terapias basadas en el trasplante (Jiang et al., 2002).

1.3.6.1.- LAS SIMILITUDES Y DIFERENCIAS ENTRE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS Y ADULTAS.

Células madre humanas embrionarias y adultas tienen ventajas y desventajas con respecto al uso potencial de terapias basadas en células regenerativas. Una diferencia importante entre células madre adultas y embrionarias es su capacidad diferente en el número y tipo de los tipos de células diferenciadas que pueden llegar a ser. Las células madre embrionarias pueden convertirse en todos los tipos celulares del cuerpo, porque son pluripotentes. Las células madre adultas se cree que se limitará a diferenciarse en distintos tipos de células de su tejido de origen. Las células madre embrionarias pueden cultivarse con relativa facilidad en el cultivo. Las células madre adultas son escasas en los tejidos maduros, por lo que el aislamiento de estas células de un tejido adulto es un reto, y los métodos para ampliar su número en el cultivo de células aún no se han resuelto. Esta es una distinción importante, ya que un gran número de células son necesarias para las terapias de reemplazo de células madre (Jiang et al., 2002). Se cree que los tejidos derivados de células madre embrionarias y adultas pueden diferir en la probabilidad de ser rechazado después del trasplante. Aún no se sabe si los tejidos derivados de células madre embrionarias podrían causar el rechazo de trasplante.

Las células madre adultas y los tejidos derivados de ellos, se estima que actualmente son menos propensos para el rechazo después del trasplante. Esto se debe a que las propias células del paciente podrían ampliarse en el cultivo. El uso de células madre adultas y los tejidos derivados de células adultas del propio paciente madre significa que las células tienen menos probabilidades de ser rechazados por el sistema inmune. Esto representa una ventaja significativa, como el rechazo inmunológico sólo puede evitarse mediante la administración continua de medicamentos inmunosupresores, y las propias drogas pueden provocar efectos secundarios perjudiciales (Jiang et al., 2002).

1.3.6.2.- PLASTICIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS.

Las células madre de origen adulto son células indiferenciadas aisladas de órganos o sistemas completamente desarrollados en el estadio adulto. Aunque se encuentran en muy pocas cantidades, se ha demostrado la presencia de células madre adultas en muchos tejidos: médula ósea, sangre periférica, músculo esquelético, hígado, páncreas, epitelio de la piel y del intestino, pulpa dental, córnea y retina del ojo, y en el sistema nervioso central, incluyendo el cerebro y la médula espinal. En muchos de ellos realizan una imprescindible tarea de auto-renovación y mantenimiento de la homeostasis tisular. Las células madre adultas de las que se dispone de más conocimientos son las células del sistema hematopoyético de la médula ósea, capaces de regenerar completamente todas las células sanguíneas y del sistema inmunitario.

Las células madre adultas, sin embargo, son muy difíciles de aislar y obtener en grandes cantidades. Su capacidad de proliferación *in vitro* es mucho más reducida que la de las ESC o EGC. De hecho, en numerosos estudios sobre las propiedades de diferenciación de las NSC o los progenitores neuronales se ha seguido la estrategia de immortalizar estas células mediante la inserción de oncogenes, para conservar la capacidad de auto-renovación en estado indiferenciado, y estudiar de esta manera su potencial tanto *in vitro* como después del trasplante (Martínez- Serrano y Björklund 1997).

El potencial de diferenciación de las células madre adultas es también más limitado que el de las ESC o EGC (Temple, 2001). Sin embargo, actualmente, nuevos experimentos están haciendo reconsiderar el concepto de la plasticidad de las células madre adultas, puesto que, bajo ciertas condiciones *in vitro*, estas células están demostrando una potencialidad mucho más elevada de lo que se creía hasta ahora. Se ha comprobado que, tanto *in vitro* como en trasplantes *in vivo*, podrían generar tipos celulares de otros órganos totalmente distintos de los de su origen, incluso de capas germinativas diferentes a la original. Células madre de la médula ósea, de origen mesodérmico, han sido diferenciadas a tejido neural, cuyo origen es ectodérmico (Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000). Por otro lado, NSC obtenidas del cerebro adulto han generado células hematopoyéticas (Björnson et al., 1999) o incluso muchos otros tipos celulares en un embrión quimérico (Clarke et al., 2000). En varios estudios se demuestra como, después de transplantadas, estas células son capaces de integrarse en el huésped y asumir fenotipos maduros (Brazelton et al., 2000; Ferrari et al., 1998; Kocher et al., 2001; Mezey et al., 2000; Orlic et al., 2001).

Algunas de estas observaciones, sin embargo, podrían deberse a fenómenos de fusión celular en vez de transdiferenciación (Alvarez-Dolado et al., 2003; Weimann et al., 2003). Hay un importante debate, en la actualidad, sobre si lo que se observa en estos experimentos son fenómenos de transdiferenciación, desdiferenciación, programación génica, fusión celular o varios de ellos a la vez (Wurmser y Gage 2002; Ying et al., 2002). Hasta el presente momento, sin embargo, no se ha podido demostrar que una sola célula madre adulta sea capaz de generar todos los tipos celulares de un organismo adulto, tal y como lo hacen las ESC y EGC. Tampoco se sabe si esta sorprendente plasticidad se da realmente *in vivo* de forma natural o si sólo son fenómenos observables en condiciones de cultivo. De todas formas, aunque sólo se dé *ex vivo*, esta sorprendente plasticidad puede ser aprovechada para el desarrollo de terapias celulares basadas en células madre adultas.

1.3.6.3.- PAPEL EN LA RENOVACIÓN CELULAR DEL ORGANISMO

Se están acumulando pruebas de que desde la vida perinatal a la adulta van apareciendo células madre en los tejidos somáticos, como parte de la estrategia del organismo para su renovación en condiciones fisiológicas o ante un daño. Esto nos lleva a la conclusión aparentemente paradójica de que en realidad las células madre de adulto no son células “primitivas” derivadas directamente del embrión temprano, sino que serían células que aparecen tardíamente, “especializadas” en suministrar células de repuesto al organismo adulto. Un descubrimiento de mediados de los 90 parece apoyar esto: existen células madre neuronales en el cerebro anterior de mamíferos, rodeando al ventrículo lateral, y participan en la repoblación de la subepéndima del ventrículo tras irradiación, y en los roedores son la fuente de nuevas neuronas que migran hasta el bulbo olfativo. Además, en monos migran por una ruta desconocida hasta la corteza cerebral asociativa (la que contribuye a los mecanismos de memoria). La identidad exacta de las células madre neuronales está sometida a controversia, ya que algunos las localizan como células de la epéndima que rodean a los ventrículos, mientras que otros las hacen coincidir con los astrocitos de la zona subventricular. Las células madre del sistema nervioso central (SNC) pueden generar los tres grandes tipos de células del cerebro adulto: neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Pero se desconoce la importancia y significado real de estas células madre. Puede ser que en verdad el SNC del adulto mantenga una cierta capacidad de autorrenovación, como rasgo adaptativo según las especies. Quizá en los animales superiores la formación local de nuevas neuronas en ciertas estructuras cerebrales tenga algo que ver con los mecanismos de creación e integración de la memoria. Además, hace poco se han aportado pruebas de que los estímulos ambientales pueden intervenir en la regulación de la formación de neuronas (Brazelton et al., 2000; Ferrari et al., 1998; Kocher et al., 2001; Mezey et al., 2000; Orlic et al., 2001).

Las células madre mesenquimales (MSC) humanas están presentes en el estroma de la médula ósea, constituyendo una población totalmente diferente de las células madre hematopoyéticas, y su papel es contribuir a la regeneración de los tejidos mesenquimáticos (hueso, cartílago, músculo, ligamento, tendón, tejido adiposo y estroma). Se han aislado y cultivado MSC humanas, y lo que es mejor, se ha logrado su diferenciación controlada hasta células con rasgos típicos de osteocitos, condrocitos o adipocitos, respectivamente (Wurmser y Gage 2002; Ying et al., 2002).

1.3.7.- TERAPIAS DE SUSTITUCIÓN CELULAR.

La terapia con células madre está en la vanguardia de la investigación biomédica actual. Cada vez hay más evidencias de que la célula madre tumoral puede estar implicada en el origen del cáncer como se propone en el modelo jerárquico. La célula madre puede transformarse en maligna por procesos de pérdida de la división asimétrica, transferencia genética horizontal, fusión celular, factores microambientales. Conocer mejor cómo se produce esta transformación permitirá diseñar abordajes de terapia celular más seguros y nuevos tratamientos específicos contra estas células madre tumorales (Jordan et al., 2006).

Las terapias de sustitución celular son el objetivo más común de la mayor parte de investigación actual en células madre, si bien son, *a priori*, las que representan un

reto más importante. A grandes rasgos, se basan en la diferenciación del tipo adecuado de célula madre hacia el fenotipo celular que se desee, de una forma controlada, homogénea y en las cantidades suficientes, para transplantarlas en la zona donde se espera que reemplacen la función de las células anormales.

Una terapia de sustitución celular se basa en los siguientes procesos (Figura 18):

- 1.- Obtención y aislamiento de las células madre con las propiedades celulares adecuadas a partir de la fuente que se considere óptima.
- 2.- Expansión de estas células en estado indiferenciado hasta conseguir la cantidad suficiente que se necesite.
- 3.- Diferenciación eficaz y controlada hacia el tipo de células especializada que se precise para el tratamiento. Este proceso debe ser lo más eficaz y homogéneo posible. Puede ser necesaria una completa especialización o simplemente una restricción parcial de los progenitores.
- 4.- Transplante de las células de la médula ósea para, integrarse en el tejido y desarrollar su función correctamente. Para garantizar el éxito de la terapia puede resultar imprescindible realizar exámenes importantes antes del transplante.

1.3.7.1.- OBTENCIÓN Y MANIPULACIÓN DE CÉLULAS MADRE.

Existen distintas fuentes de células madre con diferentes propiedades de replicación y diferenciación. Los principales tipos de célula que se han investigado para su posible aplicación en terapias de sustitución para enfermedades hematológicas son las ESC y otras como, las NSC en el caso de las enfermedades neurodegenerativas y líneas de células inmortalizadas.

Hasta el momento han sido extraídas ESC de blastocistos de ratón, mono y hombre (Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1995; Thomson et al., 1996; Thomson et al., 1998). Pueden ser expandidas en cultivo durante largo tiempo. ESC humanas, por ejemplo, han sido cultivadas durante más de 2 años duplicando su población más de 300 veces (Odorico et al., 2001). EGC humanas, por el contrario, sólo se han cultivado hasta unas 70-80 duplicaciones (Shamblott et al., 2001). Poco se conoce de los factores que mantienen las células madre en estado indiferenciado y proliferante. Normalmente las ESC se cultivan sobre una capa de fibroblastos embrionarios murinos (MEF) mitóticamente inactivados (Evans y Kaufman 1981; Martin 1981; Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998) y con la presencia de suero fetal bovino (FCS).

Estos fibroblastos secretan factores solubles que inhiben la diferenciación espontánea y mantienen las ESC en estado indiferenciado (Smith et al., 1988). Uno de estos factores es el factor inhibidor de la leucemia (LIF) (Williams et al., 1988). Las ESC murinas, a diferencia de las humanas, pueden ser cultivadas en presencia de LIF, que sustituye la acción de la capa de fibroblastos (Reubinoff et al., 2000; Thomson et al., 1998; Xu et al., 2001). Si las ESC son cultivadas en flotación forman los llamados cuerpos embrioides, agregados clonales compuestos de mezclas de ESC indiferenciadas, progenitores, y células diferenciadas espontáneamente hacia toda clase de fenotipos.

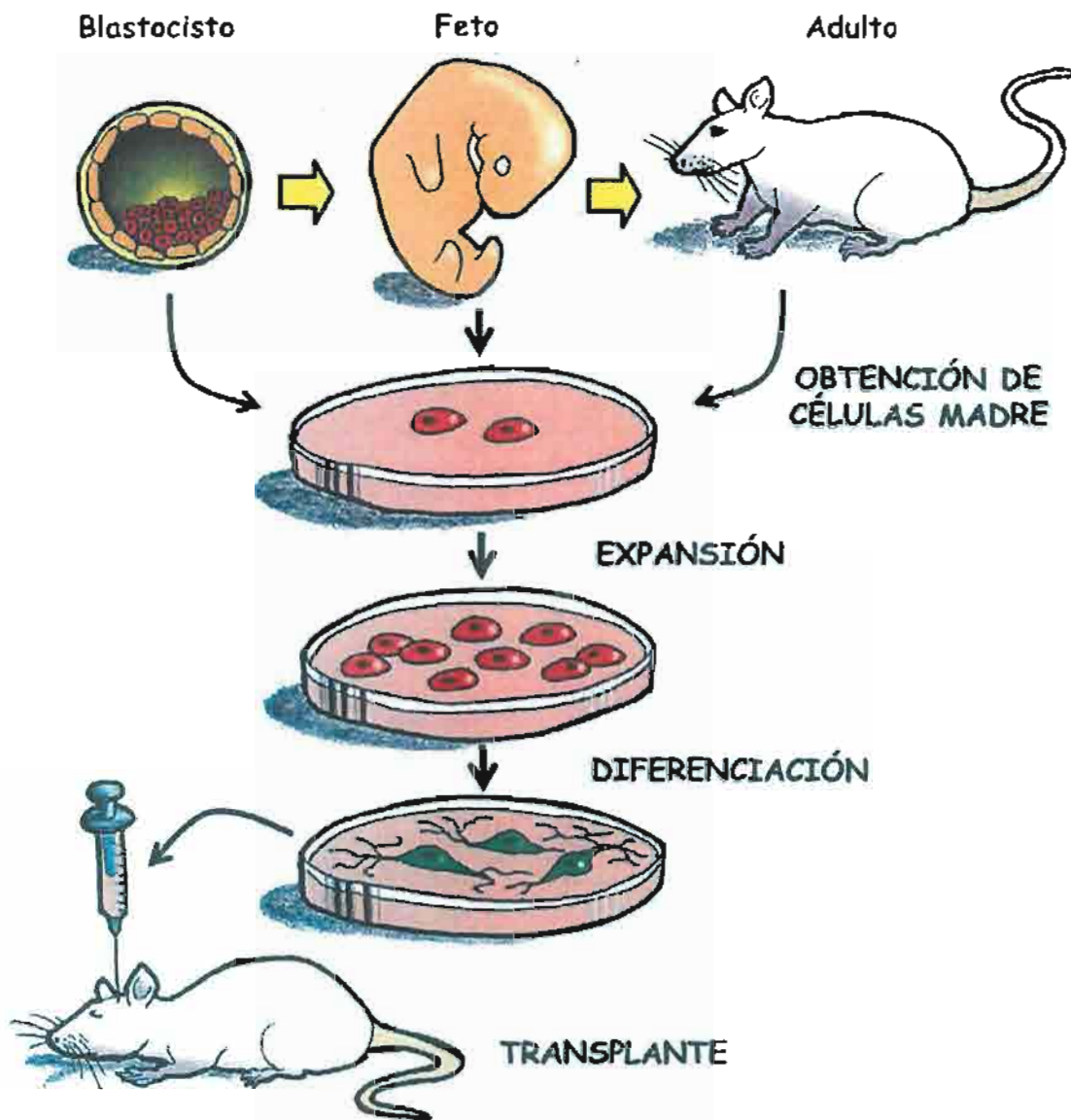


Fig. 18. Fases de un ensayo de terapia de sustitución celular en modelos experimentales. Las células madre se pueden obtener de diferentes fuentes, se expanden, se diferencian hacia el tipo celular adecuado y se transplantan en un animal adulto.

1.3.8.- DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS MADRE.

El principal reto para la futura aplicación de las terapias de sustitución celular es el control sobre la diferenciación de las células madre. Cada enfermedad necesita reemplazar un tipo concreto de células. Es necesario, por lo tanto, el desarrollo de procedimientos que conduzcan eficazmente a las células madres hacia los tipos específicos de células que se precisen en cada caso.

La mayor parte de datos obtenidos hasta el momento a partir de trasplantes de todos los diversos tipos de células madre nos indican una clara necesidad de una diferenciación previa al trasplante (Bjorklund y Lindvall 2000; Donovan y Gearhart 2001; Rossi y Cattaneo 2002; Temple 2001).

¿Cómo se puede dirigir la diferenciación de las células madre *in vitro*? Las ESC siguen procesos de diferenciación espontánea cuando se las cultiva en forma de cuerpos embrioides, o cuando se les retiran los factores que las mantienen indiferenciadas, como el LIF o la capa de fibroblastos de soporte (Donovan y Gearhart 2001). La adición de ácido retinoico (RA) las induce a adquirir fenotipos celulares (Bain et al., 1996; Dinsmore et al., 1996; Okada et al., 2004).

En el trasplante e integración funcional, el último paso de una terapia de sustitución celular es el trasplante de las células manipuladas *in vitro* directamente en la zona donde se espera que realicen su acción terapéutica. Para garantizar el éxito de la terapia hay que asegurar, en primer lugar, la supervivencia de las células implantadas. En los trasplantes de tejido fetal es común una supervivencia del 5-10% del número total de células transplantadas (Brundin et al., 2000). En segundo lugar, es necesario asegurar la conservación del fenotipo adoptado previamente *in vitro*.

Dependiendo del tipo de leucemia que se pretende revertir, los requerimientos después del trasplante pueden ser aún más complicados (Bjorklund y Lindvall 2000; Rossi y Cattaneo 2002). En algunos casos será suficiente que las células transplantadas conserven el fenotipo adecuado.

1.3.9.- EL DEBATE SOBRE EL USO TERAPÉUTICO DE LAS CÉLULAS MADRE

El uso terapéutico de las células madre ha surgido, en los últimos años, como un nuevo modo de la medicina: sustituir o regenerar aquellas células destruidas por la enfermedad degenerativa (diabetes juvenil, Parkinson, esclerosis múltiple, etc.) o a causa de un accidente, como el infarto de miocardio o la lesión de la médula espinal (Bradley y Robertson, 1986). Esta investigación surge y da sus primeros pasos en un contexto muy complejo: el hecho de usar inicialmente como fuente de células madre, las que forman la masa interna del embrión humano de cinco días (Robertson, 1986). En principio, aquellos embriones que son calificados como 'sobrantes' de la práctica de las técnicas de reproducción humana asistida. Y por ello, este campo biomédico de una excepcional importancia, ha estado envuelto en el debate sobre la investigación destructiva de embriones humanos y sobre el destino de los que están criados conservados (Bradley y Robertson, 1986; Robertson, 1986). Con frecuencia, se reduce y desvirtúa la problemática científica y ética en un simple "embriones humanos" para curar las enfermedades degenerativas: sí o no' (Smith, 1992). Pero la cuestión no es esa.

Una investigación para estudiar enfermedades y buscarles soluciones no puede, ni ética ni técnicamente, tener como material de partida el que con lleve destrucción de vidas humanas. La ciencia está a otro nivel mucho más avanzado. Un ser humano, de menos o de más de 14 días, implantado en el útero materno o congelado, deseado para procreación o abandonado, es un ser humano que nadie puede arrogarse el poder de matarlo para usarlo como medio (Keller, 1995; Robertson, 1997), por muchos beneficios para la humanidad que se deriva de ello. Esta no es una cuestión de prejuicios religiosos. Ni la investigación biomédica debe dejarse manipular de opciones o presiones políticas, o intereses meramente económicos. Ha pasado el tiempo de los discursos demagógicos que usan la sensibilidad de todo buen nacido hacia el dolor ajeno.

Si hace unos pocos años podría haber cabido alguna duda de la necesidad de estas preciadas y polémicas células hoy se sabe, con rigor científico, que no hay enfermos cuyas vidas estén dependientes de que se permita legalmente descuartizar embriones para que les sean suministradas, injertadas o inyectadas estas células (Gardner y Brook, 1997).

Las cuestiones que se han ido planteando están resueltas afortunadamente y son de hecho una esperanza fundada de curar esas enfermedades graves; en este campo se ha traspasado ya el ámbito de la mera promesa o aspiración utópica (Gardner y Brook, 1997). En primer lugar, se cuenta con la presencia en la sangre y en la médula ósea, en la grasa y en todos los órganos y tejidos del organismo (Dani et al., 1998), con células madre capaces porque esa es su función propia y natural de regenerar o sustituir aquellas células destruidas o dañadas (Nichols et al., 1998). En los tres últimos años, y con una frecuencia casi semanal, ha ido conociéndose cómo son y cómo funcionan estas células propias y en muchos casos qué se tiene que hacer para que se sitúen en su lugar propio y cumplan su función. Pacientes con infarto o con la enfermedad de Parkinson están siendo ya curados con éxito gracias a sus propias células madre (Raz et al., 1999). Ciertamente queda mucho por saber de ellas y de su eficacia a largo plazo, pero hoy por hoy su uso no ha presentado aún ningún problema. También es bien cierto que los trabajos pioneros con las células madre procedentes de embriones han sido muy útiles para poner en el tapete estas nuevas terapias. Tras varios años de trabajo quedan muy claras las tres conclusiones siguientes (Nichols et al., 1998; Raz et al., 1999).

En primer lugar, los experimentos con embriones de ratones han puesto de manifiesto que estas células madre embrionarias no pueden ser transferidas a ningún paciente: son tan poco 'domesticables' que producen tumores en el organismo en que se introducen y actúan en él demasiado por libre (Blau, 2001). No vale la pena, ni tiene sentido, seguir por esa vía de convertir células embrionarias en células del tipo diferenciada e inmadura que ya de por sí tiene el cuerpo y las tiene además situadas en su sitio.

En segundo lugar, sí merece la pena continuar investigando con ellas y sacándoles sus valiosos secretos. Pero esa investigación puede hacerse en células animales y en último caso de los cadáveres de los embriones sobrantes, que la reforma actual de la ley permitirá para llevar a cabo los proyectos para los que sean imprescindibles. Y por último, aquellas investigaciones que exijan que las células sean del tipo embrionario y además humano (y además sin el riesgo de que tengan defectos genéticos por proceder de embriones deprogenitores con problemas de esterilidad), hoy se puede ya ir a ellas con paz: hay capacidad de conseguirlas sin producir ni destruir embriones. Años de fuerte esfuerzo han dado sus resultados. Ha habido reportes de las impresionantes fotos de células de diversos tejidos derivadas de las del tipo madre embrionarias de una partenogénesis; sin tocar un embrión humano (Raz et al., 1999).

Aun sigue sumida en la demagogia la necesidad de llevar a cabo el eufemismo acientífico de la clonación terapéutica. No existe hoy por hoy ninguna posibilidad de clonar un mono y menos aún un ser humano (Soria et al., 2001). Va siendo hora de llamar a las cosas por su nombre; y pasar el núcleo de una célula a otra, sin más reprogramación del material genético (Nagy et al., 1993; Udy et al., 1997), no es clonar es simplemente hacer una transferencia nuclear. Hay investigaciones a fondo para producir células del tipo deseado manipulando células y no manipulando seres humanos. Los primeros descubrimientos en esta línea están ya conseguidos. De esta forma, para aquellas enfermedades degenerativas, por ejemplo en la ceguera de la retinosis pigmentaria, que no pueden ser curadas con las células propias del paciente se empieza a contar con material celular sano híbrido: mitad suyo y mitad ajeno (Brustle et al., 1999).

1.4.- LEUCEMIA

1.4.1.- ANTECEDENTES HISTORICOS

En la década del '60, representaba una enfermedad mortal con un 80% de fallecimientos a los 6 meses de diagnosticada la enfermedad. Posteriormente, gracias a un mayor conocimiento del desarrollo tumoral, se desarrollaron efectivos esquemas de tratamiento con un índice de curación entre un 50 y 70% de los casos.

Para poder defenderse, el cuerpo tiene soldados que a toda hora lo recorren y están alertas para entrar en acción en cuanto aparece alguna señal de peligro. Estos soldados, los glóbulos blancos, están en la sangre y tienen una vida muy corta (Hampson et al., 2007).

Apenas algunas horas y es por eso, que el organismo necesita fabricarlos en forma permanente para mantenerse en óptimas condiciones. Dentro de ese ejército que es el sistema inmunológico, la médula ósea es el órgano encargado de generar a los soldados y ponerlos a trabajar. Pero, a veces es invadida y el sistema colapsa.

La médula ósea activa se localiza en el interior de algunos huesos (en los adultos, gran parte del interior óseo está ocupado por grasa) y tiene la misión de producir las células de la sangre (Ersvaer et al., 2007).

Cuando está invadida por células atípicas que ocupan el espacio y crecen sin regulación en forma ilimitada, no puede funcionar normalmente. Y a este tipo de cáncer se le llama leucemia. Es decir que, la leucemia o cáncer de la sangre se produce porque en la médula ósea hay otras células que invaden y no permiten que fabrique glóbulos blancos. En algunos casos, cuando la leucemia es de peor pronóstico o vuelve a producirse después de haber sido combatida mediante quimioterapia, el tratamiento que se propone en la actualidad para tratar de salvar la vida de la persona es el trasplante de médula ósea (Terapia Celular), (Ryningen et al., 2006).

Generalmente las células cancerosas están definidas por dos propiedades hereditarias:

1. Ellas y su progenie se reproducen a pesar de las restricciones normales.
2. Invaden y colonizan territorios normalmente reservados para otras células.

La combinación de estas características es lo que hace a los cánceres especialmente peligrosos (Jo de Mejia y Lila, 2006).

En los últimos 50 años la ciencia médica ha desarrollado tratamientos cada vez más efectivos para las víctimas de la leucemia, que incluyen nuevas drogas, terapias transfusionales, tratamientos de apoyo y antibióticos, así como el trasplante de células progenitoras periféricas (comúnmente conocido como trasplante de médula ósea). Con el mejor tratamiento disponible, el 75% de las víctimas jóvenes de la más común de las leucemias infantiles (leucemia linfoblástica) está sin enfermedad por lo menos cinco años después de que la leucemia le fue diagnosticada y de haber terminado con el tratamiento. Este es un hito al cual muchos médicos consideran una señal de cura. Las perspectivas para los adultos con leucemia también están mejorando debido al avance en los tratamientos. Cada día aumentan los informes de tratamientos exitosos a pacientes adultos con leucemia, con sobrevividas a más de cinco años (Greer, 2004).

A medida que avanza la enfermedad, la función de la médula ósea se deteriora y las células normales de la sangre se reducen drásticamente y, si la enfermedad no es controlada, las células anormales se incrementan y son transportadas al cuerpo por el torrente sanguíneo. Sin controlar, la leucemia puede producir infecciones debido a la falta de glóbulos blancos normales capaces de combatirlas, anemia grave por la falta de

glóbulos rojos capaces de transportar oxígeno y moretones y hemorragias debido a la falta de plaquetas (Mandelli et al., 2002).

Hay formas de leucemia menos comunes que afectan a otro tipo de células sanguíneas. La leucemia monocítica afecta a los monocitos (grandes glóbulos blancos barredores que forman parte del sistema inmunológico), la eritroleucemia ataca a los eritrocitos (células primitivas parientes de los glóbulos rojos) que se encuentran en la médula ósea. Sin embargo, el diagnóstico y tratamiento de los distintos tipos de leucemia es parecido (Greer, 2004).

La leucemia fue descubierta en el mundo hace casi 200 años, por lo que puede considerarse un problema reciente comparado con otros grandes flagelos de la humanidad. Desde su descripción inicial, las leucemias han sido foco de una impresionante investigación médica, debido a varias razones: sus dramáticas manifestaciones clínicas, su frecuencia e impacto en la niñez, su hallazgo en animales, la sencillez de los análisis de la sangre periférica y de la médula ósea que permitieron comprender mejor la hematopoyesis, y su forma de tratamiento, adaptada posteriormente a otros tipos de neoplasias en el ser humano. Sin embargo, el aspecto cumbre de su estudio fue el descubrimiento, hace 30 años, de que la variedad más común en el niño, la leucemia linfocítica aguda, podía curarse en al menos la mitad de los casos (Aur et al., 1971), la primera vez que esto se conseguía en una neoplasia generalizada.

La leucemia fue descubierta casi al mismo tiempo por dos médicos brillantes que llevaron a cabo estudios cuidadosos, tanto en sus enfermos como en autopsias (Dameshek y Gunz, 1964).

El primero en describir esta enfermedad fue Velpeau en 1827, el cual observó un paciente de 63 años con fiebre, debilidad y un crecimiento descomunal del abdomen. Él encontró en la autopsia un hígado y un bazo enormes (el bazo pesó 4 kilos), y la “sangre era como una papilla de avena que recordaba la consistencia y el color de las levaduras del vino tinto” (Velpeau, 1827).

Por otra parte, Barth (1856) estudió en 1839 un paciente cuya sangre fue analizada por Donné (1844), el cual observó en la autopsia al microscopio, unos “glóbulos mucosos muy parecidos a las células del pus”. De acuerdo con esta secuencia, Donné habría sido la primera persona que describió microscópicamente las células leucémicas. Los estudios iniciales de pacientes vivos con leucemia se hicieron en 1845 por tres investigadores de la época: Virchow (1845) en Alemania, el cual llamó a la enfermedad sangre blanca y fue el primero en proponer que el problema no era infeccioso sino una patología diferente que afectaba a ciertos órganos, y Bennett (1845) y Craigie (1845) en Escocia, los cuales reconocieron también la entidad como un problema propio de los glóbulos blancos. Virchow (1856), quien llegaría a ser uno de los grandes hombres en la patología mundial, introdujo dos años después el término leucemia, el cual ha perdurado hasta nuestros días, dado que el nombre de leucocitemia propuesto por Bennett (1852) prevaleció sólo por corto tiempo. Virchow diferenció en su trabajo la leucemia de la leucocitosis, describiendo a la vez dos tipos de leucemia: el esplénico, asociado con esplenomegalia, y el linfático, donde se presentaba aumento de tamaño de los ganglios linfáticos. Años después, en 1857, hubo otros aportes novedosos. Friedreich (1857) describió por primera vez una modalidad de leucemia que llamó aguda, y Neumann (1878) estableció la existencia de la leucemia mielógena, conceptos novedosos para aquel tiempo.

Es importante aquilatar el trabajo de estos pioneros en el descubrimiento de la leucemia, sobre todo porque científicamente, la clasificación y el estudio de la leucemia no pudieron visualizarse sino hasta que se conoció la tinción de Erlich (1891) en 1891,

la cual permitió diferenciar las distintas etapas madurativas de los leucocitos e identificar las diferentes variantes de las células leucémicas. Resulta también interesante conocer que desde 1903 la leucemia se clasificaba en aguda (linfocítica, mielocítica, monocítica o eritroleucemia) y en crónica (linfocítica o mielocítica) (Reschad y Schilling-Torgau 1913). Sin embargo, no fue sino hasta 1930, al comenzar a realizarse en Europa los aspirados de médula ósea, que empezaron a comprenderse mejor las alteraciones morfológicas de las células madres que producen esta enfermedad (Clemmensen, 1974).

1.4.2.- ETIOLOGIA

Desde las descripciones de Virchow (1845) hasta nuestros días, la etiología de la leucemia ha sido un aspecto controversial entre diversos investigadores, y sus causas han pasado por diferentes etapas: infecciosa, genética, física o química. En el momento actual, después de arduas discusiones entre diversos grupos, debería concluirse que todos los enfoques podrían tener algo de cierto y que la verdadera etiología de la leucemia es probable que se encuentre en la interacción de varias de esas causas.

1.4.2.1.- ETIOLOGÍA INFECCIOSA

Desde los primeros casos en el mundo se llegó a definir que las células leucémicas son distintas a las de los procesos inflamatorios o infecciosos. Pese a ello, el interés sobre este punto se ha mantenido hasta el presente, sobre todo porque algunos investigadores han demostrado la presencia de virus como agentes causales de las leucemias humanas y de los animales (Gross, 1951). En 1951, Gross (1951) demostró un virus en una leucemia de los ratones, y posteriormente se aislaron virus en las leucemias de los gatos, monos, ganado vacuno y la leucemia humana T linfocítica (Rickard et al. 1969, Miller et al. 1969, Kawakami et al. 1972, Poiesz et al. 1980). Todos esos virus fueron clasificados como retrovirus. Por otra parte, dos virus ADN del grupo del Herpes se han asociado con leucemia: el de la enfermedad de Marek en los pájaros (Churchill y Biggs 1967) y el de Epstein-Barr en la leucemia/linfoma tipo B en los niños africanos (Linfoma de Burkitt) (Epstein et al. 1964). A pesar de estos informes, la causa infecciosa en otros tipos de leucemia continúa considerándose una hipótesis.

1.4.2.2.- ETIOLOGÍA GENÉTICA

Esta posibilidad fue sugerida por Hartenstein (Engelberth-Holm, 1876) en 1896, el cual estudió una vaca y su ternero con leucemia. Durante los años treinta se presentaron informes de leucemia en ratones y su progenie (Slye, 1931), lo cual hizo que en años posteriores se encontraran tres familias con miembros que padecían leucemia (Ardashnikov, 1937), observándose incluso varios casos en gemelos (MacMahon y Levy 1964). Sin embargo, un estudio en Boston en 1957 no encontró ninguna relación entre parientes (Steinberg, 1957), aunque estudios más recientes confirmaron que los hermanos de un niño con leucemia tienen de 2 a 4 veces más

probabilidades de desarrollar leucemia que el resto de la población infantil (Miller, 1971, Draper et al. 1977). La posibilidad de que el gemelo de un paciente leucémico desarrolle leucemia se encuentra cercana al 25% (Zuelzer y Cox 1969), habiéndose también identificado un mismo rearrreglo genético (inmunoglobulina de cadena pesada) en las células leucémicas de gemelos siameses con leucemia linfocítica aguda (Pombo de Oliveira et al., 1986). En 1993 se identificó el arreglo genético MLL, que involucra la translocación $t(11;19)(q23;p13)$, en tres pares de gemelos afectados con LLA tipo T, cuyas características fenotípicas incluían CD2+, CD3+, CD7+ (Ford et al., 1993). A pesar de que desde 1930 se informó leucemia en el síndrome de Down (Brewster y Cannon 1930), no fue sino hasta 1957 cuando se hizo un estudio amplio sobre esta relación (Krivit y Good 1957). Además, durante los años sesenta comenzó a relacionarse la leucemia infantil con la inmunodeficiencia primaria, con alteraciones cromosómicas y con otros tipos de cáncer (Miller, 1967), descubriéndose en esa época el cromosoma Filadelfia en la leucemia mieloide crónica (Rowley, 1973). Otro hallazgo importante dentro de las alteraciones genéticas de las leucemias, fue el descubrimiento del homólogo humano del encogen *abl* del virus de la leucemia murina. Este gen compromete a los cromosomas 9 y 22, produciendo el gen híbrido BCR-ABL, el cual se encuentra característicamente en la leucemia granulocítica crónica (De Klein et al., 1982). También es relevante citar que los síndromes de Bloom y de Schwachman, las anemias de Fanconi y de Diamond-Blackfan y la neurofibromatosis, entre otras patologías, presentan un riesgo aumentado de desarrollar leucemia (Baruchel et al. 1999).

1.4.2.3.- ETIOLOGÍA FÍSICA

La historia de María Curie y la leucemia que ella misma desarrolló, siempre se han asociado a la radiación recibida por la investigadora durante sus largos años de estudio. Aun así, no fue sino hasta 1944 cuando esta relación empezó a preocupar a los radiólogos (March, 1944). Los estudios en los sobrevivientes de las bombas atómicas en Japón y las investigaciones subsiguientes en casos de accidentes nucleares, demostraron con claridad que la radiación ionizante en niños puede ser causa inequívoca de leucemia (Simpson et al. 1955). La perspectiva de que los campos electromagnéticos, generados por las líneas eléctricas de alto voltaje, aumenten el riesgo de leucemias, se presentó como una posibilidad en 1979, pero fue descartada en un trabajo posterior (Campion, 1997). Sin embargo este punto continúa en discusión.

1.4.2.4.- ETIOLOGIA QUÍMICA

Aunque a partir de 1928 se había empezado a sospechar de las sustancias químicas como origen de leucemia en adultos con trabajos riesgosos, poco a poco se han incluido otras posibilidades, como la de niños que por viajar en los autos de sus padres con las ventanas cerradas se convierten en fumadores pasivos. Con el advenimiento de la quimioterapia se empezaron a descubrir casos de segundas neoplasias después de los tratamientos anticancerígenos, tanto en niños como en adultos. En la actualidad, los agentes alquilantes, el etopósido y el tenipósido (Tucker et al., 1987) también se incluyen como causas etiológicas de leucemia. Sin embargo, todavía se siguen investigando cuáles sustancias químicas podrían producir leucemia de novo en niños. Como ya se mencionó, la etiología de las leucemias requiere mayor investigación y no será nada sencillo poder definir muchos casos que presenten esta

patología, ya que es probable que un buen número de pacientes tenga etiologías combinadas.

1.4.3.- DIAGNÓSTICO DE LAS LEUCEMIAS

Los análisis de sangre periférica, médula ósea y líquido cefalorraquídeo, con la ayuda de tinciones citoquímicas, son la base del diagnóstico y clasificación de las leucemias (Bennet et al. 1985). Empero, las variaciones morfológicas de las células leucémicas comenzaron a plantear una serie de dificultades diagnósticas en cuanto a su identificación precisa, haciéndose necesario realizar otros estudios para clasificar las distintas variantes de ella, entre los cuales pueden citarse los análisis cromosómicos, la citoquímica y el inmunofenotipo, que junto con la edad del paciente, el número de leucocitos y la invasión inicial a otros órganos, permiten definir los factores de riesgo de cada paciente. Otra tecnología que ha ayudado a los pacientes leucémicos han sido los equipos de aféresis, ya que gracias a ellos se consiguió por primera vez transfundir leucocitos, plaquetas o eritrocitos en forma exclusiva. En la actualidad, la citometría de flujo, la citogenética y los estudios de biología molecular, junto a los análisis tradicionales ya citados, son las principales ayudas para definir el diagnóstico y evaluar el pronóstico y seguimiento de los pacientes con leucemia.

1.4.4.- SINTOMATOLOGIA DE LAS LEUCEMIAS

Los síntomas de las leucemias agudas son la fiebre irregular, el sangrado espontáneo por las encías, membranas mucosas o bajo la piel, y anemia de rápida evolución. Las leucemias mielocítica crónicas se caracterizan además por el aumento del bazo, y las leucemias linfocíticas crónicas por la tumefacción de los ganglios linfáticos (Reiter et al., 2004). La detección temprana de la enfermedad es de vital importancia para el tratamiento. Los síntomas al comienzo de la leucemia son: facilidad para que se formen hematomas, sangrar sin coagular, fiebre alta, continua debilidad, fatiga crónica, dolor de huesos y articulaciones e infecciones recurrentes (Reiter et al., 2004).

1.4.5.- TIPOS DE LEUCEMIA

1.4.5.1.- LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA (LLA).

El nombre alternativo es leucemia linfocítica aguda de la infancia. Es una enfermedad maligna progresiva, caracterizada por un gran número de células blancas sanguíneas inmaduras semejantes a los linfoblastos que se pueden encontrar en la sangre, la médula ósea, los ganglios linfáticos, el bazo y otros órganos. La leucemia linfocítica aguda (LLA) es la causante del 80% de las leucemias agudas de la infancia, con un máximo de incidencia entre los 3 y 7 años. Asimismo, se presenta en personas adultas con un promedio del 20% de todos los casos de leucemias. En la leucemia aguda, las células malignas pierden su capacidad para madurar y especializarse (diferenciación) en sus respectivas funciones; además, se multiplican rápidamente y

reemplazan a las células normales. La insuficiencia de la médula ósea ocurre cuando las células malignas reemplazan a los elementos normales de ésta, lo que hace que las personas sean más susceptibles a las hemorragias e infecciones a medida que las células sanguíneas normales se reducen en cantidad. La mayoría de los casos parecen no tener causa aparente; sin embargo, se cree que las irradiaciones, algunas toxinas como el benceno y ciertos agentes quimioterapéuticos pueden contribuir a la inducción de la leucemia. Las anomalías en los cromosomas también pueden jugar un papel en el desarrollo de la leucemia aguda. Los factores de riesgo para la leucemia aguda son: el síndrome de Down, un familiar con leucemia, la exposición a irradiaciones, los químicos y los medicamentos. La incidencia de esta condición es de 6 de cada 100.000 personas (Greer, 2004).

1.4.5.2.- LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (LLC).

Es la malformación de los glóbulos blancos conocidos como linfocitos, caracterizada por un aumento lento y progresivo de estas células en la sangre y en la médula ósea. La leucemia linfocítica crónica (LLC) afecta los linfocitos B y produce inmunosupresión, insuficiencia de la médula ósea e infiltración de células malignas (cancerosas) a los órganos. Por lo general, los síntomas y el curso de la enfermedad avanzan gradualmente. La LLC se presenta en personas mayores; el 95% afecta individuos por encima de los 50 años. Muchos casos son detectados mediante exámenes de sangre de rutina en personas que no presentan síntomas. La causa de LLC es desconocida. No se ha determinado relación con la radiación, químicos carcinógenos, ni con virus. Se ha notado una incidencia aumentada de LLC en personas con ciertas enfermedades autoinmunes. La incidencia incrementa con la edad en proporción de 15 de cada 100.000 personas hacia los 70 años de edad (Greer, 2004).

1.4.5.3.- LEUCEMIA MIELOCÍTICA CRÓNICA (LMC).

Actualmente, la Leucemia Mieloide Crónica (LMC), enfermedad maligna de la sangre y médula ósea, afecta a más de 6 mil mexicanos, de los cuales aproximadamente 40% desconoce padecer la enfermedad, situación que retrasa el diagnóstico y limita la esperanza de vida en quienes la padecen. Los nombres alternativos son: Leucemia granulocítica crónica; leucemia mielógena crónica. Es un cáncer maligno de la médula ósea que causa crecimiento rápido de las células formadoras de sangre, conocidas como precursoras mieloides, en la médula ósea, sangre periférica y tejidos del cuerpo. Además la leucemia mieloide crónica (LMC) es un desorden mieloproliferativo de múltiples líneas, clonal, que se origina en una única célula madre hematopoyética anormal. Implica líneas mieloide, monocítica, eritroide, megacariocítica y linfoide B, y algunas se extienden a la línea linfoide T (Fialkow, 1981). A pesar de que la enfermedad se describió primero en la literatura inglesa en 1845, el primer hecho destacado sobre su estudio no tuvo lugar hasta 1960 cuando Nowell y Hungerford descubrieron en células de leucemia una anomalía citogenética constante, denominada más tarde cromosoma Philadelphia (Ph) (Nowell y Hungerford, 1960). Posteriormente, se estableció que el cromosoma Ph estaba asociado con hechos genéticos que causaban LMC y, de este modo, dicha enfermedad se convirtió en el primer cáncer humano en el que una anomalía citogenética específica podía ser vinculada a su patogénesis. Después hubo un rápido progreso en la comprensión de la

biología molecular de la LMC, y algunos de los cambios fundamentales de la fase crónica de la LMC, que ocurren a nivel de DNA, han sido actualmente elucidados completamente.

Hasta los 80, la LMC ha sido considerada inexorablemente fatal. Después, y de forma gradual, se fue viendo claramente que el trasplante alogénico de células madre (SCT) hemopoyéticas podía curar algunos (pero no todos) de los pacientes sometidos a este tratamiento. Al mismo tiempo, se demostró que interferón alfa (IFN α) podía suprimir la proliferación de células de LMC y prolongar la supervivencia. A finales de los 80, se introdujo como tratamiento para pacientes que habían recidivado, después de SCT alogénico, una inmunoterapia adoptiva con linfocitos alorreactivos (Mughal y Goldman, 1995). Más recientemente, el inhibidor de la tirosina quinasa, STI 571, se ha mostrado muy prometedor en estudios iniciales, pero aún no se ha definido su papel en el tratamiento de pacientes recién diagnosticados. Por lo tanto, la decisión de cómo tratar mejor al paciente con LMC, recién diagnosticado, ha llegado a ser sumamente compleja.

Característicamente, la LMC es una enfermedad bifásica o trifásica, presentándose la mayoría de pacientes en la fase “crónica” (FC) estable inicial, que dura típicamente 3 a 6 años. La historia natural de la LMC implica una progresión espontánea hacia una fase más avanzada, término que incluye fase de aceleración y crisis blástica. Aproximadamente la mitad de los pacientes en fase crónica se transforman directamente en crisis blástica, y el resto lo hacen después de un período intermedio de fase de aceleración de duración variable. En la enfermedad avanzada, las células de LMC fracasan en la maduración y, cuando ocurre la crisis blástica, las células predominantes en sangre y médula se parecen a mieloblastos (transformación blástica mieloide) o linfoblastos (transformación blástica linfoide) hallados en pacientes con leucemias agudas.

1.4.5.3.1.- BIOLOGÍA MOLECULAR.

El cromosoma Ph es una anomalía citogenética adquirida, presente en todas las células de LMC (Fig. 19). Se forma como resultado de una translocación recíproca de material genético del brazo largo de un cromosoma 9, y del brazo largo de un cromosoma 22, referido como t(9;22) (q34;q11). Esta translocación da como resultado una yuxtaposición de secuencias 3' del gen protooncogén ABL (Abelson), normalmente presente en el cromosoma 9, con las secuencias 5' del gen BCR (*breakpoint cluster region*) truncado, que permanece en el cromosoma 22. Este hecho genera el gen quimérico de fusión BCR-ABL (Deininger, 2000).

El clásico cromosoma Ph puede ser identificado en alrededor del 85% de pacientes que cumplen criterios hematológicos de LMC. En un 5% adicional de pacientes, la translocación es compleja, implicando generalmente tres o más cromosomas, que incluyen el 9 y el 22. En aproximadamente un 10% de pacientes, no se puede identificar, mediante citogenética convencional, ningún cromosoma Ph; dentro de esta cohorte, un 40% tiene un gen quimérico BCR-ABL oculto, localizado generalmente en un cromosoma 22 aparentemente normal, pero localizado muy ocasionalmente en el cromosoma 9. El restante 6% de pacientes son Ph-negativa, BCR-ABL-negativo, y algunas de estas mutaciones han sido identificadas en otros genes (Groffen y Heisterkamp, 1997). Es probable que estos últimos pacientes tengan un curso clínico más agresivo que aquellos con enfermedad Ph-negativa, BCR-ABL-positivo. A medida que la enfermedad progresa, los pacientes Ph-positiva pueden

adquirir alteraciones citogenéticas adicionales, incluyendo duplicación del cromosoma Ph, trisomía 8 y iso-cromosoma 17q. Mutaciones o deleciones de genes supresores del tumor, tales como p16 y TP53, también pueden contribuir a la progresión de la enfermedad (Sawyers, 1999).

El gen de fusión BCR-ABL transcribe un mRNA que codifica una proteína que tiene una actividad tirosina quinasa muy superior que la proteína ABL normal. Dependiendo de la localización del punto de ruptura en el gen BCR, la proteína de fusión puede variar en tamaño, desde 190 kD hasta 230 kD. Han sido identificadas tres localizaciones separadas, de puntos de ruptura, en el gen BCR, y se han denominado, de manera bastante confusa, M-BCR, m-BCR y μ -BCR, respectivamente (Melo, 1996).

La ruptura en la principal región de ruptura (M-BCR) siempre tiene lugar en el intrón entre exones e13 y e14 (referidos previamente como exones b2 y b3) o en el intron entre exones e14 y e15 (previamente b3 y b4). Por el contrario, la posición del punto de ruptura en el gen ABL es altamente variable y puede ocurrir en casi cualquier posición río arriba del exón a2. La mayoría de pacientes con LMC con el clásico cromosoma Ph, expresan una proteína de 210 kD (p210BCR-ABL). En contraposición, una ruptura en el primer intrón del gen BCR, en un área denominada *breakpoint cluster region* (m-BCR) menor entre exones e1 y e2, da como resultado la transcripción de un e1a2 mRNA, que codifica una proteína de 190 kD (p190BCR-ABL). Esto se halla en aproximadamente dos tercios de pacientes con leucemia aguda linfoblástica Ph-positivo (Abuja, 1991).

La tercera ruptura en el gen BCR ocurre entre exones e19 y e20, en un área denominada *breakpoint cluster region* (μ -BCR) micro. El mRNA producido, e19a2, codifica una proteína más larga de 230 kD (p230BCR-ABL), que se halla en aquellos casos muy raros de leucemia neutrofilica crónica asociada a cromosoma Ph (Pane et al., 1996).

El cromosoma Philadelphia (cr. Ph) es la primera anomalía citogenética asociada a una hemopatía maligna, la leucemia mieloide crónica (LMC). Resulta de la translocación recíproca t(9;22)(q34;q11), y da lugar a la formación del gen híbrido BCR/ABL. El producto de este gen es la proteína de fusión anómala p210bcr-abl, responsable de la desregulación de la actividad tirosina cinasa del gen ABL que se considera el mecanismo central en la patogenia de la LMC.

Tres regiones del gen BCR contienen los distintos puntos de rotura del cromosoma 22: la M-bcr (major Breakpoint Cluster Region), la m-bcr (minor) y la μ -bcr (micro). En el 95% de LMC la translocación afecta la región M-bcr que comprende los exones 12 a 16 (e12-e16). En la mayoría de éstas, la rotura ocurre en el intrón 13 ó 14, dando lugar las variantes génicas e13a2 y e14a2 (=b2a2 y b3a2) que codifican la proteína anómala p210bcr-abl. Sin embargo, el 0,5% de las LMC cr. Ph⁺ son BCR/ABL- al estudiarse por técnicas de PCR con cebadores específicos de M-bcr. Esto se debe a que la rotura puede producirse en la región m-bcr, dando lugar a la variante e1a2 que codifica otra proteína anómala de 190 kDa (p190bcr-abl). Estos casos presentan cuadros algo distintos de la LMC clásica, intermedios entre LMC y leucemia mielomonocítica crónica, cursando con monocitosis y displasia. Se han descrito otras variantes BCR/ABL, como la que se deriva de la rotura en m-bcr (e19a2), que codifica una proteína de 230 kDa (p230bcr-abl). Los pacientes cursan, en estos casos, con un cuadro similar al de la leucemia neutrofilica crónica (LNC-like), aunque deben considerarse afectados de LMC.

Aunque el gen BCR/ABL se considera un marcador de LMC, no es exclusivo de esta entidad. Existe un grupo de leucemias agudas linfoblásticas de novo (LAL) en el adulto, más frecuente en la LAL-B común, que presenta la variante de tipo m-bcr responsable de la p190bcr-abl. También en algunas leucemias agudas linfoblásticas de tipo T, en

leucemias agudas mieloides (LAM), y en casos aislados de síndromes mielodisplásicos en transformación aguda, se ha podido detectar la presencia del gen BCR/ABL asociado a proteínas p210bcr-abl ó p190bcr-abl (Abuja, 1991; Pane et al., 1996).

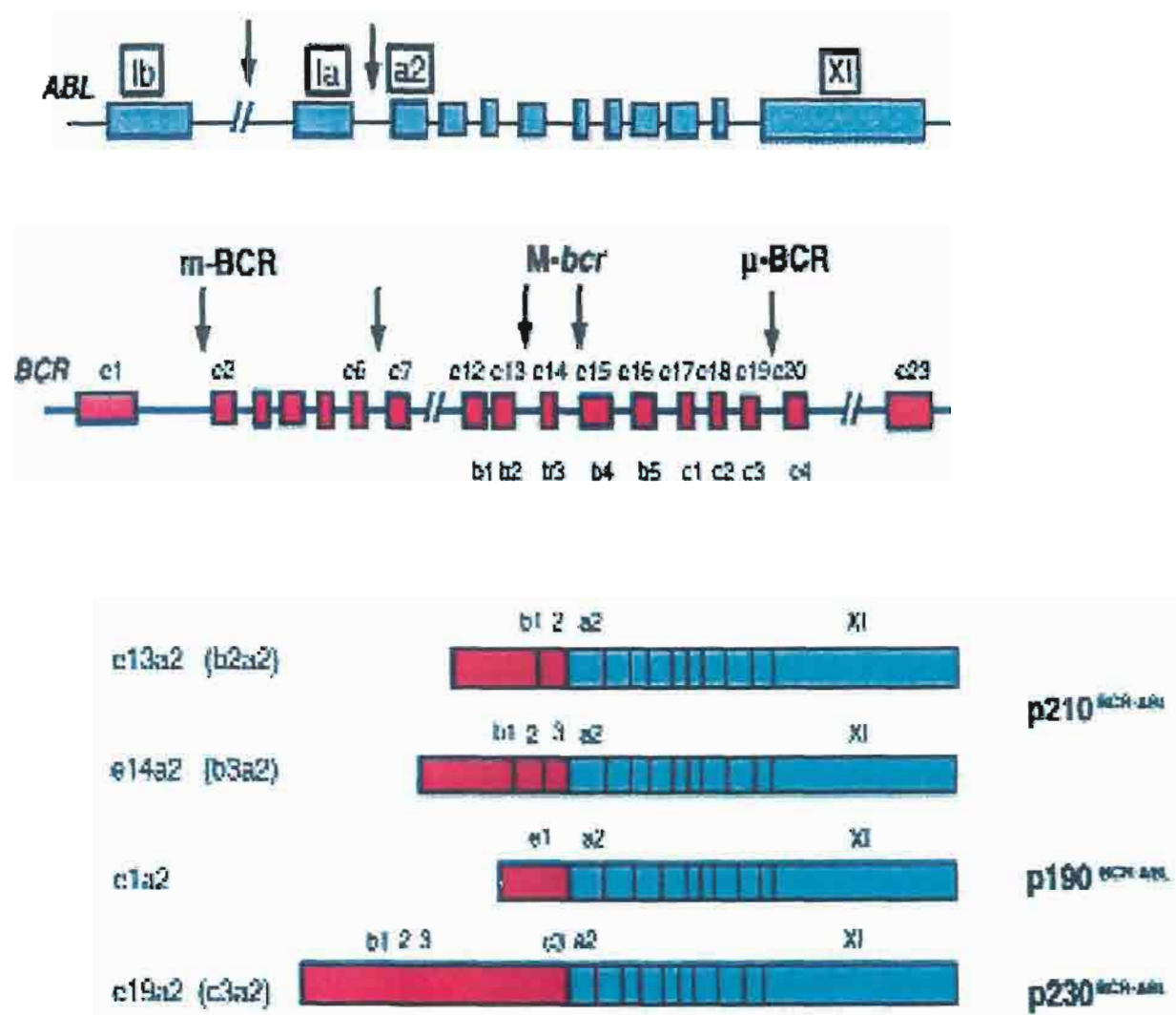


Fig.19 Representación esquemática de varios puntos de ruptura en los genes ABL y BCR, y proteínas codificadas en leucemias BCR-ABL positivos.

Los distintos puntos de ruptura dentro de M-BCR dan como resultado dos transcripciones de BCR-ABL quimérico, ligeramente distintas. Una ruptura que tiene lugar en el intrón entre exones e13 y e14 origina un mRNA e13a2 (o b2a2), mientras que una ruptura en el intrón entre exones e14 y e15 produce un mRNA e14a2 (b3a2). La mayoría de pacientes con LMC tienen transcripciones e13a2 o e14a2, pero en aproximadamente un 10% de los casos están presentes ambas transcripciones. El tipo de transcripción de BCR-ABL no tiene ninguna importancia pronóstica significativa, excepto por un recuento de plaquetas más elevado en pacientes con transcripciones e14a2 (Shepherd, 1995).

Se ha centrado mucho la atención en determinar qué papel juegan varias proteínas BCR-ABL en la patogenia de la LMC. Actualmente, se han implicado tres posibles mecanismos, que no son necesariamente exclusivos mutuamente (Faderl, 1999). Estos son activación constitutiva de la señal mitogénica, adhesión reducida de células a estroma y matriz extracelular, y apoptosis reducida. A pesar de que se sabe mucho sobre las interacciones anómalas entre la oncoproteína BCR-ABL y otras moléculas citoplasmáticas, los detalles precisos de los pasos a través de los cuales está mediatizada la señal proliferativa defectuosa, tales como los pasos RAS-MAP quinasa, JAK-STAT y PI3 quinasa, son incompletos.

Las células madre hematopoyéticas normales sobreviven, pero deben mantenerse en estado de reposo (o fase G0 profunda), como resultado de la proliferación de células de LMC. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, estas células normales pueden ser inducidas a proliferar, lo cual proporciona la base para el autoinjerto como tratamiento de la LMC. También existe evidencia de una subpoblación profundamente quiescente de células progenitoras primitivas que son Ph-positiva (Holyoake, 1999). Ésta podría ser una razón por la cual fármacos citotóxicos ciclo-activos solos, incluso a dosis altas, suelen fracasar en la erradicación del clon de la LMC. La progresión hasta fases avanzadas viene anunciada a menudo por células Ph-positiva que adquieren cambios cromosómicos adicionales, presumiblemente como resultado del incremento de la inestabilidad genética. Recientemente, ha sido demostrado que la longitud del telómero en células Ph-positiva se acorta, y la enzima, telomerasa, necesaria para mantener la longitud del telómero, no está regulada a medida que la enfermedad del paciente entra en fases avanzadas (Brümmendorf, 2000). Por lo tanto, la longitud del telómero parece tener algunas implicaciones pronósticas. Los pacientes en fase crónica que tienen telómeros más largos tienden a irles mejor, particularmente en relación a la respuesta a IFN- α (Iwana, 1997).

1.4.5.3.2.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y DIAGNÓSTICO.

La mayoría de los pacientes presentan típicamente astenia y anorexia o trastornos abdominales debidos a esplenomegalia, pero el 30-40% de pacientes son asintomáticos, y el diagnóstico se realiza a partir de un análisis de sangre de rutina. El hallazgo físico principal es un bazo palpable, que se observa en hasta tres-cuartos de pacientes. Hepatomegalia y linfadenopatía son poco comunes. Ocasionalmente, algunos pacientes tienen “cloromas” o “sarcomas granulocíticos” con depósitos subcutáneos de leucemia extramedular. A diferencia de los pacientes en FC, los que están en fase avanzada están a menudo sintomáticos, con fiebre, dolor óseo, hemorragia y sudación excesiva. No es infrecuente el dolor esplénico debido a infarto esplénico (Sokal, 1984).

El diagnóstico de LMC se realiza frecuentemente por las características de la extensión de sangre periférica y biopsia de médula ósea. El análisis citogenético para detectar la presencia del cromosoma Ph es de confirmación. Estudios moleculares para evidenciar el producto BCR-ABL proporcionan una confirmación adicional. Sangre periférica generalmente muestra una leucocitosis que implica células en todos los estadios de diferenciación, dentro de la línea mieloide (Fig. 20). Basofilia es una característica diagnóstica importante, ya que su ausencia sugiere otras alteraciones mieloproliferativas, sobre todo si tanto el cromosoma Ph como el gen BCR-ABL están ausentes. También puede estar presente eosinofilia, pero no tiene ninguna relevancia diagnóstica (Hasford, 1998).

Existe una monocitopenia relativa, a pesar de que los valores absolutos pueden estar incrementados en correspondencia con la leucocitosis. Esto diferencia la LMC de la leucemia mielomonocítica crónica. Son frecuentes trombocitosis con anisocitosis de plaquetas y células rojas nucleadas. La médula ósea es marcadamente hipercelular, con pérdida de los espacios grasos normales y un incremento de la relación mieloide eritroide debido a la predominancia de células mieloides, en particular neutrófilos y mielocitos. En los precursores no existen características de maduración anómala. Los megacariocitos están aumentados y pueden formar grupos, siendo menos acusados que los que se observan en la trombocitemia esencial. La fibrosis reticulínica suele estar ausente o ligeramente aumentada en el momento del diagnóstico (Hasford, 1998).

Se han llevado a cabo varios esfuerzos para establecer criterios definibles en el momento del diagnóstico, que pueden ayudar a pronosticar la supervivencia de cada paciente en particular. El método utilizado más frecuentemente es el propuesto por Sokal y colegas (1984), según el cual los pacientes pueden ser clasificados en varias categorías de riesgo, basándose en una fórmula matemática que tiene en cuenta edad del paciente, tamaño del bazo, porcentaje de blastos en sangre y recuento de plaquetas en el momento del diagnóstico (Sokal, 1984). La estratificación de los pacientes en las categorías de riesgo bueno, intermedio y pobre, puede ayudar en el proceso de decisión respecto a opciones de tratamiento apropiadas. Sin embargo, desde un punto de vista clínico, el mejor indicador pronóstico parece ser la respuesta al tratamiento inicial con interferón alfa (IFN- α); los pacientes que logran un grado de respuesta citogenética tienen mejor supervivencia (Hasford, 1998).

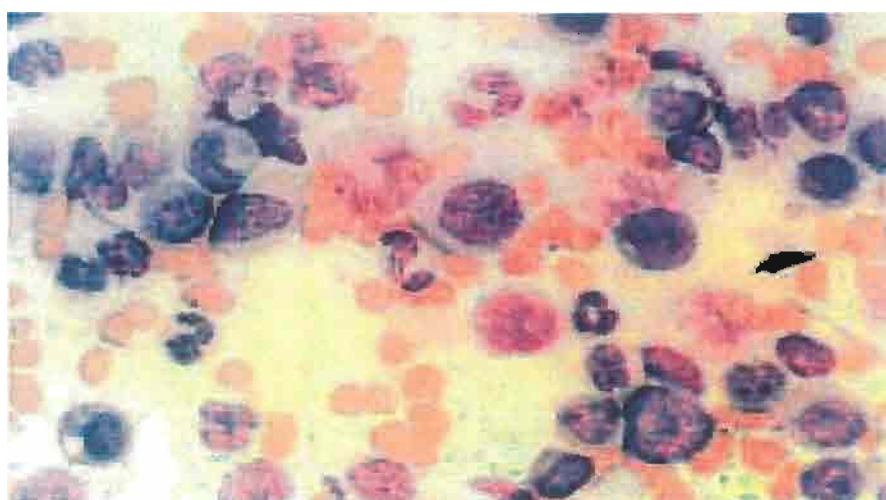


Fig. 20. Extensión de sangre periférica de un paciente con LMC, en fase crónica.

1.4.5.3.3.- ESTRATEGIA TERAPÉUTICA

Los progresos recientes en el tratamiento de pacientes con LMC han hecho que las decisiones para cada paciente en particular sean más complicadas. A pesar de que algunos pacientes con LMC pueden curarse mediante SCT alogénico, es necesario valorar cuidadosamente los riesgos asociados con el mismo. El momento preciso del

trasplante es aún objeto de controversia. Los resultados de aloinjerto han mejorado en los últimos años, pero las opciones terapéuticas distintas al trasplante también lo han hecho considerablemente. De este modo, IFN- α induce un control hematológico en una proporción significativa de pacientes y proporciona alguna mejoría en la supervivencia, especialmente en aquellos pacientes que logran un grado de respuesta citogenética, en comparación con hidroxiurea. Sin embargo, es raro conseguir una remisión molecular con IFN- α . La llegada de STI 571 abre una perspectiva de más progreso. Por lo tanto, es prudente discutir con el paciente las ventajas relativas de los distintos tratamientos, en el momento del diagnóstico y de la estrategia de tratamiento propuesta (Allan, 1995).

1.4.5.3.4.-TRANSPLANTE ALOGÉNICO DE CÉLULAS MADRE.

El SCT alogénico, utilizando células madre derivadas de sangre o médula ósea de un hermano donante HLA-idéntico, llevado a cabo en la fase crónica, ofrece a una proporción substancial de pacientes con LMC, la probabilidad de una supervivencia libre de leucemia a largo plazo (LFS) y la posibilidad de curación (Goldman et al., 1986; Gratwohl et al., 1993). Datos recogidos por el International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) mostraron una LFS a los 5 años del 55-60% (Horowitz, 2000). La probabilidad de recidiva a los 5 años fue del 15%. Los pacientes más jóvenes responden mejor que los más mayores y los resultados generalmente son mejores cuando el SCT se realiza en fases iniciales de la LMC. Actualmente, los otros determinantes principales de supervivencia están razonablemente bien caracterizados (Gratwohl, 1988). Estos comprenden grado de histocompatibilidad entre donante y paciente y duración de la fase crónica. Gratwohl et al., diseñaron un modelo de evaluación de riesgo que incluye estos cuatro factores principales que podrían tener un efecto en la probabilidad de supervivencia después del trasplante. Atribuyeron una puntuación para cada uno de estos factores y concluyeron que para pacientes con todos los factores favorables, LFS a los 5 años es del 70-80%, mientras que para aquellos con muchos factores de pronósticos pobres es del 15-20%.

Es posible que las pautas cito-reductoras utilizadas previamente al trasplante y las medidas preventivas de la enfermedad del injerto contra el huésped (GVHD) también influyeran en el resultado. También es importante el estatus de citomegalovirus (CMV) de los pacientes; no es infrecuente que pacientes CMV seropositivo reactiven el mismo, lo cual puede causar infección clínicamente significativa. Esto puede estar asociado con un riesgo incrementado de mortalidad, especialmente en pacientes receptores de células madre de donantes no relacionados (Craddock et al., 2001). Las ventajas relativas de utilizar células madre derivadas de médula ósea o sangre periférica aún no se han establecido por completo. Células madre derivadas de la sangre dan como resultado un prendido más rápido del injerto, facilitando aparentemente un mayor efecto del injerto contra la leucemia, en comparación con las células madre derivadas de la médula (Elmaagacli et al., 1994). Sin embargo, parece existir una incidencia más alta de GVHD importante después de aloinjertos de células madre de la sangre. También ha habido cierta preocupación acerca de que el tratamiento previo con IFN- α podría afectar adversamente los resultados de un aloinjerto posterior (Horowitz et al., 1996). Más recientemente, un estudio alemán llegó a la conclusión de que si IFN- α era interrumpido más de 90 días antes de SCT, no se

observaban efectos adversos significativos (Hehlmann, 1999). No se sabe si el tratamiento previo con STI 571 podría tener riesgos similares.

En familias típicas, de Europa y Norteamérica, sólo cerca del 30% de pacientes tienen uno o más hermanos genéticamente idénticos en cuanto a HLA y, utilizando límites de edad convencionales, el 50% de pacientes serán demasiado mayores (>55 años) para un trasplante. De este modo, sólo el 15% de todos los pacientes serán elegibles como donantes para trasplantes. Por lo tanto, los esfuerzos se han centrado en investigar donantes voluntarios apropiados, no relacionados (VUD), y en condicionar mejor las pautas en un intento de reducir la toxicidad. Históricamente los resultados de VUD-SCT han sido inferiores a los de SCT con hermano HLA-pareados, debido a un porcentaje incrementado de fracaso del injerto, GVHD y TRM. Resultados actuales de VUD-SCT del grupo de Seattle para pacientes con un perfil favorable sugieren una LSF del 74% a los 5 años, en pacientes que están por debajo de los 50 años de edad, y son trasplantados dentro del año del diagnóstico (Hansen et al., 1998). Éstos y otros resultados parecidos han llevado a un mayor perfeccionamiento en la búsqueda de VUDs apropiados para hacer más disponible el SCT (Szydlo et al., 1997). Técnicas más nuevas para tipificación molecular de genes clase I deberían mejorar las posibilidades de hallar HLApareados fenotípicamente o donantes insuficientemente pareados aceptables (Spencer et al., 1995).

1.4.5.3.5.- TRASPLANTE DE CÉLULAS MADRE CON CONDICIONAMIENTO DE BAJA INTENSIDAD (O NO MIELOABLATIVO).

En las pautas de condicionamiento utilizadas convencionalmente para pacientes sujetos a SCT alogénico se han empleado dosis mieloablativas de quimio-radioterapia diseñadas para erradicar de forma permanente la hematopoyesis maligna en el paciente, y facilitar el injerto de células madre del donante. Estas pautas están asociadas con toxicidad, dando como resultado un TRM significativo, particularmente en pacientes mayores de 50 años de edad, y en aquellos con condiciones de co-morbilidad. Recientemente, se ha observado que es probable que el potencial curativo del aloinjerto sea resultado, en gran parte, de un efecto leucemia *-versus-* injerto (GVL), mediado inmunológicamente. Esto señala un avance apasionante en nuestra comprensión de cómo funciona realmente el SCT (Barrett y Malkovska, 1996).

La evidencia más convincente de un efecto GVL proviene de la observación de que las infusiones de leucocitos de donante (DLI) pueden reinducir remisiones en pacientes que han recidivado después de un SCT alogénico (Dazzi et al., 2000). Este efecto ha sido más notable en pacientes con LMC y mieloma múltiple, pero también se observa en otras hemopatías malignas. Estas observaciones conducen al desarrollo de pautas de condicionamiento de intensidad reducida, que son no-mieloablativas, pero aún inmunosupresivas (Slavin et al., 1998). Sin embargo, a pesar de que estas pautas son bien toleradas, están asociadas con un riesgo significativo de GVHD, que sigue siendo una causa significativa de mortalidad y morbilidad. Los pacientes que son quimeras mixtas pueden experimentar menos GVHD en comparación con quimeras plenas, pero estos pacientes también pueden tener un potencial disminuido para el efecto GVL, necesario para el control a largo plazo de las células malignas. Los estados quiméricos mixtos pueden ser modificados por manipulación inmune, con DLI o suspendiendo la profilaxis de GVHD (Barrett y Childs, 2000).

Aún debe trabajarse mucho para determinar la pauta de condicionamiento no mieloablativa óptima para cada paciente en particular, en términos de elección del

fármaco, dosis administrada y combinaciones de fármacos (Champlin et al., 2000). Con una mejor comprensión de los mecanismos de GVHD y el papel de la depleción de células T, probablemente será posible definir y expandir las poblaciones de células T que atacan el tejido tumoral, mientras se excluyen aquellas poblaciones de células T que atacan el tejido normal. En el momento actual existen varias cuestiones no resueltas, algunas de las cuales son: ¿cuál debería ser el límite superior de edad para trasplantes no mieloablativos de células madre (NMSCT)?, ¿es esencial la radioterapia para la pauta de condicionamiento?, ¿es necesaria la globulina antitimocito (ATG)?, ¿debería ser utilizada la depleción de células T?, en caso afirmativo, ¿cómo?, ¿cómo monitorizar el quimerismo pos-NMSCT?, ¿cómo debería monitorizarse la enfermedad mínima residual (MDR)?, ¿cuáles son las indicaciones reales de DLI?, ¿pueden utilizarse linfocitos T citotóxicos específicos (CTL)?, También será importante definir de forma más precisa las terminologías utilizadas de “condicionamiento convencional” “condicionamiento reducido”, “condicionamiento mínimo”, “mini-SCT”, “STC con condicionamiento de baja intensidad” y “SCT no mieloablativo”.

1.4.5.3.6.- TRATAMIENTO DE RECIDIVA DE LMC POST SCT.

La mayoría de pacientes que recidivan post alo-SCT lo hacen dentro de los 3 primeros años. La recidiva tiende a seguir una progresión ordenada, inicialmente con un incremento del número de transcripciones BCR-ABL mediante PCR, seguido de recidiva citogenética y después, recidiva hematológica y clínica (Mughal et al., 2000). Por lo tanto, la monitorización molecular de los receptores de alo-SCT es importante. Para pacientes con recidiva molecular se puede inducir remisión mediante retirada de la inmunosupresión o mediante transfusión de linfocitos de donante (DLI). La DLI puede inducir remisiones en el 60-80% de pacientes con recidiva molecular o citogenética (Dazzi et al., 2000; Dazzi, Szydlo y Cross, 2000). Estos resultados importantes dan más soporte al concepto de que un efecto GVL juega un papel importante en la curación de la LMC, después del aloinjerto. Actualmente, el beneficio potencial de añadir IFN- α a DLI está siendo evaluado. Pacientes que no entran en remisión con DLI pueden ser candidatos para un segundo alo-SCT, pero el riesgo de TRM es relativamente alto. La LFS a los 4 años, de un segundo alo-SCT, está alrededor del 30%.

Aún se especula sobre los mecanismos por los cuales los linfocitos T ejercen un efecto GVL. Es posible que liberen citoquinas, tales como interleuquina-2, IFN- α o transformen el factor- α de crecimiento, que suprime selectivamente la proliferación de células Ph-positivas. Es posible que células T o células naturales asesinas actúen directamente contra las células de leucemia. Quizás la posibilidad más atractiva es que reconocen aloantígenos tejido-específicos en células mieloides del huésped, tales como antígenos de histocompatibilidad menores o antígenos del tumor 1 de Wilms (Pinilla-Ibarz et al., 2000; Gao et al., 2000). Muy recientemente, se observó que PR1, una proteinasa derivada de péptido, es un antígeno importante para la respuesta inmune del linfocito T citotóxico contra la LMC (Molldrem et al., 2000).

1.4.5.3.7.- TRASPLANTE AUTÓLOGO DE CÉLULAS MADRE.

A pesar del notable éxito asociado con SCT alogénico, la mayoría de pacientes de LMC no son elegibles para este tratamiento. En comparación con el tratamiento con hidroxiurea, la mayor parte de pacientes tratados con IFN- α sólo logran una

prolongación marginal de la supervivencia. El SCT autólogo, siguiendo a una dosis elevada de quimioterapia, tiene un TRM relativo y está disponible para muchos pacientes. Análisis retrospectivos sugieren, pero sin demostrarlo, que el autoinjerto con células madre derivadas de sangre o médula puede prolongar la supervivencia (McGlave et al., 1994; Mughal et al., 1993).

Se reconoce que algunas células madre Ph-negativas sobreviven en el momento del diagnóstico en la mayoría de pacientes, dando soporte a los esfuerzos que se están haciendo para desarrollar técnicas que favorecen la reconstitución con hematopoyesis Ph-negativa. El grupo Genoa es pionero en procedimientos por los cuales células madre Ph-negativas son recogidas durante la fase de recuperación después de quimioterapia intensiva, y ha demostrado resultados exitosos con injerto, resultando en hematopoyesis Ph-negativa (Carella et al., 1997). Sin embargo, en la mayoría de casos la hematopoyesis Ph-positiva recidiva. Esto debe ser debido a células Ph-positivas residuales en el paciente o en el material autoinjertado, y ha proporcionado la razón fundamental para técnicas de purgado. Se han desarrollado varios métodos *in vitro* e *in vivo* con distinto éxito. La nueva generación de estudios de purgado *in vitro*, utilizando inhibidores de la tirosina quinasa, dirigidos contra el gen BCR-ABL, tal como STI 571, pueden mostrar más eficacia. A pesar de que la posibilidad y seguridad clínica de estas estrategias de autoinjerto distintas han sido demostradas, el papel terapéutico preciso del autoinjerto sigue siendo poco claro. Actualmente, están desarrollándose ensayos prospectivos randomizados para establecer el valor del autoinjerto en el tratamiento de pacientes con LMC.

En conclusión, los avances terapéuticos de la pasada década han hecho bastante complejo el enfoque del manejo de los pacientes con LMC. Es prudente discutir las ventajas relativas de varias opciones terapéuticas con el paciente en el momento del diagnóstico, y desarrollar una estrategia terapéutica para intentar equilibrar la supervivencia probable del paciente con opciones distintas a trasplante contra la probabilidad de curación después de un SCT alogénico. Los estimulantes resultados preliminares obtenidos con STI 571, y avances en inmunoterapia adoptiva para activar la respuesta inmune leucemia-específica, prometen hacer las decisiones terapéuticas incluso más complejas, en un futuro próximo. En el momento presente, en pacientes más jóvenes (por ejemplo, <50 o <55 años) es razonable basar una estrategia terapéutica en la decisión de si recomendar un SCT alogénico pronto, después del diagnóstico, u ofrecer un ensayo de IFN- α , o IFN- α más citarabina, o la posibilidad de STI 571 antes del aloinjerto. Por lo tanto, un enfoque es definir una cohorte de pacientes en donde el riesgo de TRM sea lo relativamente bajo, como para que uno pueda recomendar razonablemente un SCT alogénico como tratamiento principal, y definir otra cohorte para la cual no debería ser considerado el SCT alogénico en ninguna circunstancia. Esto dejaría una cohorte intermedia en la que la conveniencia de un trasplante temprano es incierta. Razonablemente, dichos pacientes podrían recibir un ensayo inicial de IFN- α (o, a su debido tiempo, de STI 571) y proceder a un alo-SCT sólo si se considera que ha fracasado el ensayo terapéutico. Actualmente, los pacientes de más de 60 años de edad se incluirían, indudablemente, en la categoría de "no alo-SCT", pero esto puede cambiar en un futuro cercano si la experiencia adicional confirma la seguridad y eficacia del SCT mieloablativo con condicionamiento de baja intensidad. Por último, uno puede especular que el alo-SCT convencional podría ser reemplazado en el futuro por un programa de tratamiento inicial con STI 571, en combinación con otros fármacos, seguido de inmunoterapia para erradicar la enfermedad residual.

1.4.5.4.- LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (LLC).

Es la malformación de los glóbulos blancos conocidos como linfocitos, caracterizada por un aumento lento y progresivo de estas células en la sangre y en la médula ósea. La leucemia linfocítica crónica (LLC) afecta los linfocitos B y produce inmunosupresión, insuficiencia de la médula ósea e infiltración de células malignas (cancerosas) a los órganos. Por lo general, los síntomas y el curso de la enfermedad avanzan gradualmente. La LLC se presenta en personas mayores; el 95% afecta individuos por encima de los 50 años. Muchos casos son detectados mediante exámenes de sangre de rutina en personas que no presentan síntomas. La causa de LLC es desconocida. No se ha determinado relación con la radiación, químicos carcinógenos, ni con virus. Se ha notado una incidencia aumentada de LLC en personas con ciertas enfermedades autoinmunes. La incidencia incrementa con la edad en proporción de 15 de cada 100.000 personas hacia los 70 años de edad (Greer, 2004).

1.4.5.5.- LEUCEMIA DE CÉLULAS PILOSAS (LCP)

También se llama Reticuloendoteliosis leucémica. Es una malignidad poco común que se origina en los tejidos productores de la sangre. La leucemia de células pilosas se caracteriza por la reducción de todas las líneas celulares de la sangre, que son: glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas. En la sangre periférica y en la médula ósea se pueden encontrar las células pilosas y es común el agrandamiento del bazo y del hígado. Las personas afectadas por este tipo de leucemia tienen un mayor riesgo de contraer enfermedades infecciosas, debido a la disminución de la resistencia del organismo contra ellas. De igual manera, hay un incremento en la tendencia al sangrado, como consecuencia de la disminución en el conteo plaquetario. La causa de esta enfermedad y los factores de riesgo son desconocidos, afecta 5 veces más a los hombres que a las mujeres y la edad media de inicio es de 55 años. La incidencia es de 4 de cada 100.000 personas (Greer, 2004).

1.5.- LINEAS CELULARES

1.5.1.- PROPIEDADES DE K562

La línea celular de K562 es derivada de una paciente con leucemia mieloide crónica (LMC) en crisis blástica, también conocida como eritroleucemia humana. La línea celular K562, una línea eritroleucémica sensible a actividad NK. La línea eritroleucémica K562 es la diana de elección en ensayos estándar de citotoxicidad mediada por células NK. Entre sus características fenotípicas está la expresión de CD32 como único receptor para Fc de inmunoglobulinas (Andersson et al., 1979). La expresión de este RFcγII puede interferir en ensayos en los que las células NK efectoras estén tratadas con mAb completos o incluso fragmentos F(ab')₂ teóricamente purificados. Para obviar estas interferencias, se ha descrito el empleo de aclarubicina, que disminuye transitoriamente la expresión de CD32, aunque su

alta toxicidad hace prácticamente inviable su utilización. La K562 carece de los marcadores de inmunoglobulinas B, virus de Epstein-Barr (EBV) y el genoma nuclear de antígeno asociado, y los receptores para EBV (Britten et al., 2002). A diferencia de las líneas B, pero al igual que las líneas T, las células K562 son rápidamente lisadas. Por otra parte, la K562 carece de antígeno T, de alta sensibilidad a la radiosensibilidad y la inhibición del crecimiento de la timidina. Las células no contienen N APase, un enzima que se encuentra en todas las líneas derivadas de células linfoides y en enfermedades linfoproliferativas. Por microscopía electrónica de barrido, se observan células a ser relativamente suave y redondeado, con un pequeño número de corto microvellocidades indiferenciada parecido a las células leucémicas. K562 es fuertemente positiva para inmunoglobulina Fc (fragmento cristalino), receptores y pinocitosis (Burger et al., 1992).

El anticuerpo para el antígeno CD56 identifica una isoforma de la molécula de adhesión neural (NCAM), un producto de procesamiento alternativo y glicosilación heterogénea, tiene pesos moleculares comprendidos entre 135 y 220 kd. En las células hematopoyéticas, la isoforma de 140 kd se expresa exclusivamente en una subpoblación de linfocitos que muestran actividad citotóxica natural (NK). Prácticamente todas las células capaces de inducir la citotoxicidad no mediada por TCR en sangre periférica expresan CD56. Esta subpoblación consta tanto de células citotóxicas naturales (CD3-/CD56+) como de un pequeño subgrupo de células T CD3(+) CD56(+). CD56 no se expresa en otras poblaciones de linfocitos T o B, monocitos, granulocitos ni eritrocitos (Clark et al., 2001). Las células K562 inducen la liberación celular provocando así su proliferación y crecimiento. La característica principal de K562 es la actividad antiinflamatoria potente asociada con la inhibición de las funciones de PMN. Tiene ausencia total en superficie de moléculas HLA, las que la convierten en una diana extremadamente sensible a la lisis mediada por las células NK en todos los ensayos de citotoxicidad realizados (Leary et al., 1987).

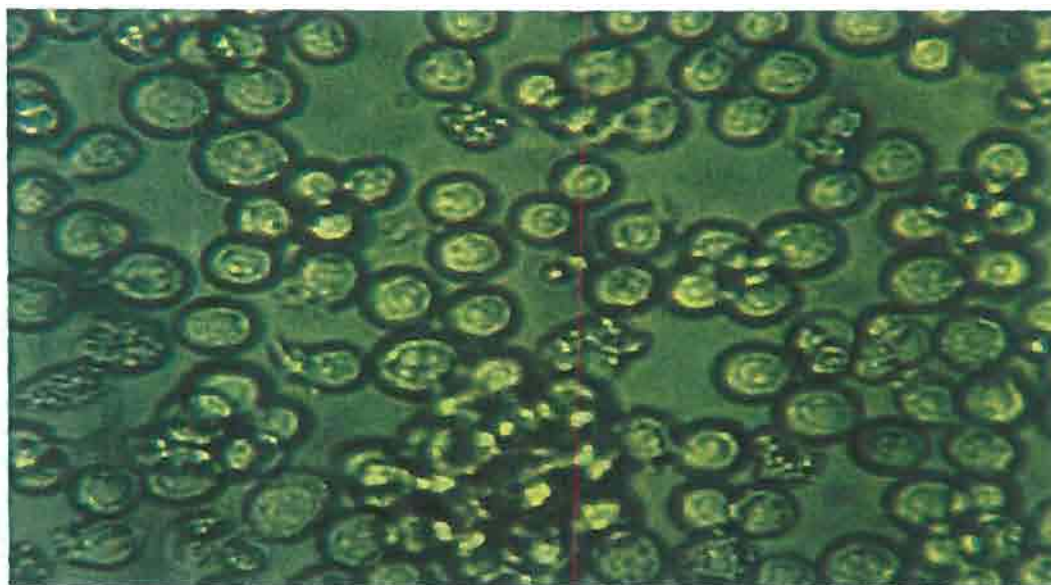


Fig. 21 *Morfología de K562 (Tomada bajo microscopio en el laboratorio de Medicina Molecular de la UPAEP).*

1.5.2.- CULTIVO DE CELULAS TUMORALES K562

La línea K562 fue cultivada y mantenida en crecimiento logarítmico en el medio de cultivo RPMI 1640, suplementado con 7,5% de suero bovino fetal y 50 μ g/mL de gentamicina. La línea fue mantenida a una temperatura de 37° C, en un ambiente húmedo, con 95% de aire y 5% de CO₂. La línea K562 crece en suspensión. Se cuenta las células usando un hemocitómetro. Cada pozo de una placa de 96 pozos recibe 160 μ L de medio conteniendo el número de células (Gao et al., 2004). El número de células por pozo de las K562 es 3,000 y el número de células por 38mL es de 712,500. Tabla 1.

Tabla 1. Número y concentración de células por pozo.

Línea celular	N° de células/pozo	N° de células/38 mL
Colo-205	2 500	593 750
K562	3 000	712 500
3T3	3 500	831 250

Características: K562 es sensible a N.K. (células de leucemia mielomonocítica, línea eritroide).

Reactivos: Medio de cultivo completo (medio RPMI 1640 + Hepes + antibiótico), células tumorales de ambas líneas, suero bovino fetal (SBF).

Materiales: Placas de cultivo, pipetas.

Método: Trabajar en condiciones estériles; flamear todo antes de hacer ninguna operación, Tubos Falcons, pipetas, bocas de Placas y tapones.

1. Preparar medio completo al 10 % ó 20 % de Suero Bovino Fetal (SBF).
2. Tomar las placas de cultivo de la incubadora, cerrando los tapones antes de sacarlos.
3. Encender el mechero.
4. Tomar placas de cultivo nuevo si lo que se desea es expandirlos.
5. Abrir las placas y agitar con pipeta suavemente para homogeneizar.
6. Extraer una alícuota del 50 % del volumen total y desechar, o bien, colocar en otra placa si se quiere expandir el cultivo.
7. Sustituir la alícuota tomada por 5 ó 6 ml de medio completo y si se ha realizado otro cultivo, completar el volumen hasta 10 ó 15 ml con medio completo.
8. Guardar las placas en la incubadora en posición vertical; o en horizontal si lo que se quiere es aumentar la velocidad y el rendimiento del cultivo.
9. Desenroscar los tapones para permitir el intercambio de oxígeno con la atmósfera de la incubadora.
10. Cambiar los cultivos de medio en días alternos. (Lunes, Miércoles, Viernes).

Observaciones: Si el medio posee un color amarillo intenso, es indicativo de un buen crecimiento y condiciones óptimas.

Si el medio tiene un color blanquecino y turbio, es indicativo de posible contaminación microbiana o micótica. El siguiente procedimiento es observar las células al microscopio y en caso de existir contaminación, destruir el cultivo.

El medio de cultivo de la línea celular K562 puede presentar una serie de agregados, que se forman de modo natural al crecer las células, se puede disgregar agitando un poco el medio (Rowley et al., 1981).

Fenotipos: CD3-, CD13+, CD19-, CD34-, CD41(+), CD42+, CD45+, CD71+, GlyA(+), (CD7+ (25%), CD1-, CD2-, CD4-, CD5-, CD7-, CD8-, CD28-, CD56-, CD57-, TCRa/b-, TCRg/d- CD10-, CD19, CD20-, CD21-, CD22-, CD80+, CD86-, CD13+, CD14-, CD15+, CD33+, CD9+, CD36-, CD41(+), CD42b-, CD61(+), CD235a+, PPO-, vWF-, CD34-, CD38-, CD45+, CD71+, HLA-DR-, TdT-, CD11b(+), CD44+, CD54+, CD25-, CD117(+), CD122+, CD132+, EPO-R+ (Drexler, 2000) y CD65+ (Lozzio, 1979).

1.5.2.1.- MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR K562

Siempre para mantener líneas celulares se debe de tener cuidado, de ser posible uso de guantes, cubre boca y bata. Lavarse bien las manos antes y después de elaborar el experimento.

- Observar las células al microscopio y verificar que el medio no se encuentre contaminado, verificar la viabilidad (morfología) y la viabilidad de las células (morfología).
- Colocar el medio de cultivo con la suspensión celular en un tubo Falcon de 15ml.
- Centrifugar pero antes de realizar este procedimiento se deberá de equilibrar en peso o volumen los tubos.
- Centrifugar las células a 1000 o 1500 rpm por aproximadamente 5 o 10 min.
- Después de este paso se obtendrá dos fases una con medio de cultivo que contiene restos celulares y también una pastilla que contiene a las células y esta se obtiene por sedimentación de la suspensión celular.
- Colocar en el tubo con la pastilla aproximadamente 3ml de medio de cultivo IMEM o RPMI 1640-FBS 10% y antibiótico antimicótico 1%) y resuspender mecánicamente (con una pipeta de 5ml) por aproximadamente 20 veces con la finalidad de que toda la solución sea homogénea.
- Colocar en una placa de petri (grande) esteril aproximadamente 8ml de medio de cultivo IMEM o RPMI 1640-FBS 10% y antibiótico antimicótico 1%) y colocar un ml de la suspensión celular que se tiene en el tubo Falcon que contiene los 3ml con las células.
- Colocar en la caja petri los datos de registro de las células (fecha, nombre de la línea celular, numero de pasaje (numero de veces que se han recambiado las células), y nombre o iniciales de quien hizo el experimento).
- No tirar la resuspensión celular con que queda en el tubo Falcon con 2ml en el fregadero, dejarlo en un vaso de precipitado para su esterilización.
- Guardar la placa de petri en la incubadora a una temperatura de 37°C y una atmosfera de 95% y 5% de CO₂.
- Repetir este proceso cada vez que se requiera tomando en cuenta los experimentos.

1.5.3.- PROPIEDADES DE CD3

En la inmunología, la T CD3-co-receptor de la célula (CD significa grupo de diferenciación) es un complejo de proteínas y se compone de cuatro cadenas distintas. En los mamíferos, el complejo contiene una cadena de CD3 γ , una cadena de CD3 δ , y dos cadenas de CD3 ϵ . Estos asociados de las cadenas con una molécula conocida como receptora de células T (TCR) y la cadena ζ para generar una señal de activación de los linfocitos T. El TCR, ζ cadena y las moléculas CD3 en conjunto constituyen el complejo TCR. El CD3 γ , CD3 δ , y CD3 ϵ cadenas están muy relacionadas con las proteínas de la superficie celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas que contiene un único dominio de inmunoglobulina extracelular (Clark et al., 2001). El CD3 γ , CD3 δ , y CD3 ϵ cadenas están muy relacionadas con las proteínas de la superficie celular de la superfamilia de las inmunoglobulinas que contiene un único dominio de inmunoglobulina extracelular (Abbas y Lichtman, 2003). La región transmembrana de las cadenas CD3 está cargado positivamente, una característica que permite a estas cadenas a asociarse con las cadenas de carga negativa TCR (contiene residuos de aspartato en la región transmembrana) (TCR α y TCR β). Las colas intracelular de las moléculas CD3 contienen un motivo conservado solo conocido como *tirosina immunoreceptor motivo basado en la activación* o del ITAM, para abreviar, que es esencial para la capacidad de señalización del TCR (Andersson et al., 1979). La fosforilación de los ITAM en la cadena CD3 hace CD3 capaz de enlazar un enzima llamado ZAP70 (zeta proteína asociada), una quinasas que es importante en la cascada de señalización de las células T. El anticuerpo para el antígeno CD3 es específico para la cadena épsilon de las cinco cadenas que forman el componente CD3 del complejo TCR (Britten et al., 2002). El peso molecular de esta cadena es de 20 kd. Es un antígeno pan-linfocitario T específico de linaje que se encuentra presentes habitualmente en la superficie celular de timocitos maduros y de linfocitos T maduros en reposo y activados de sangre periférica (tanto poblaciones inductoras como supresoras/citotóxicas) (Kindt, et al., 2008). CD3 es un marcador de células T, para distinguir una de linfocitos de un linfocito B. Normalmente las células se ven doblemente teñidas con CD3CD4 o CD3CD8 para diferenciar, contar y los subconjuntos de células T. Un recuento de CD4 normal es de unos 500-1500 y el porcentaje sobre un 35- 50% (Lozzio, 1981). Las células asesinas naturales (del inglés, Natural Killer o NK), son una clase de linfocitos cuya función es eliminar a células transformadas o infectadas por virus (Cremer et al., 1994). Fenotípicamente, se caracterizan por presentar una molécula de superficie denominada CD56. Se pueden distinguir dos grupos, aquellas que presentan una gran cantidad en la membrana celular (CD56 bright) y aquellas cuya expresión es menor (CD56 dim). El fenotipo bright está relacionado a la producción de citocinas; mientras el fenotipo dim está relacionado a la actividad citotóxica. La función principal de CD56 es la adhesión celular, sin embargo, también es expresado por diferentes células tumorales lo que sugiere cierta participación en la biología tumoral. Dentro de los factores que pueden modificar tal expresión están: la edad (Chidrawar, 2006), el sitio de residencia y el estado hormonal (Thiery et al., 1982).

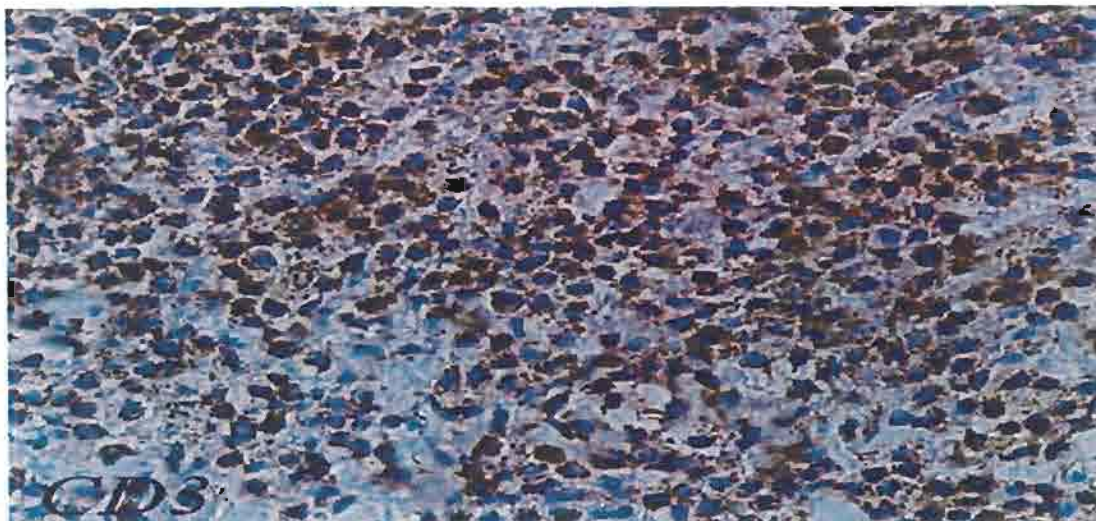


Fig. 22 Morfología de CD3

1.5.4.- PROPIEDADES DE CD56.

También se llama Leu-19, NKH1 y molecular de adhesión celular neural, NCAM. El antígeno CD56, una glicoproteína de 200-220 kDa en superficie de la célula, identificado como una isoforma de las moléculas de adhesión neural (NCAM), se ha encontrado frecuentemente y se expresa en linfocitos, varias neoplasias hematopoyéticas incluyendo las leucemias mieloides agudas (LMA) (Thiery et al., 1982).

En su estructura molecular hay NK y las células T que expresan predominantemente la isoforma 140 kDa de la N-CAM. El dominio extracelular de la N 140 kDa y la glicoproteína CAM contiene 689 aminoácidos, compuesto de 5 C2, de dominios superfamiliar de Ig y dos fibronectina dominios de tipo III. Hay 6 sitios potenciales de N-glicosilación ligados (Thiery et al., 1982). El dominio citoplasmático es de 119 aminoácidos. En la expresión principal de CD56 celular, es el marcador prototípico de las células NK humanas que también está presente en un subconjunto de células CD4 + y CD8 +, células T en sangre periférica (Rutishauser et al., 1983), y se expresa en forma variable en el cultivo in vitro de clones de células T. CD56 también está presente en el cerebro, cerebelo, la corteza neuromuscular y en ciertas leucemias, los carcinomas de pulmón de células pequeñas, de los nervios derivados de tumores, mielomas y leucemias mieloides (Lanier et al., 1989).

El anticuerpo para el antígeno CD56 identifica una isoforma de la molécula de adhesión neural (NCAM), un producto de procesamiento alternativo y glicosilación heterogénea, tiene pesos moleculares comprendidos entre 135 y 220 kd (Hercend et al., 1985). En las células hematopoyéticas, la isoforma de 140 kd se expresa exclusivamente en una subpoblación de linfocitos que muestran actividad citotóxica natural (NK) (Cunningham et al., 1987). Prácticamente todas las células capaces de inducir la citotoxicidad no mediada por TCR en sangre periférica expresan CD56. Esta subpoblación consta tanto de células citotóxicas naturales (CD3-/CD56+) como de un pequeño subgrupo de células T CD3(+)CD56(+). CD56 no se expresa en otras poblaciones de linfocitos T o B, monocitos, granulocitos ni eritrocitos. En cuanto a su función, en el sistema nervioso, hay pruebas de adherencia, tanto homófilos y heterófilos por NCAM que está implicada en el desarrollo neuronal y ha sido demostrado de manera convincente con las células hematopoyéticas (Barton et al.,

1988). No hay consenso sobre el papel de la N-CAM en función de las células T o NK, aunque ha habido informes de participación en la adhesión homofílica. Secretan citokinas (tnf- α , gm-csf, ifn- γ) (Hemperly et al., 1990).



Fig. 23 Morfología de CD56

1.6.- TERAPIAS CELULARES BASADAS EN CELULAS MADRES (CD3(+)/CD56(+)) PARA LA LEUCEMIA MIELOCITICA CRONICA (LMC).

1.6.1.- GENERALIDADES

Desde hace tiempo es conocido que diversos tejidos son capaces de autorrepararse incluso de autorregenerarse. Sobre esta base se ha venido llevando a cabo un intenso trabajo de investigación en los últimos años, con el fin de crear substitutos biológicos con la capacidad de restaurar, conservar o mejorar la función de tejidos dañados.

Estos esfuerzos se han encaminado en diferentes direcciones: Utilización de tejidos que, una vez extraídos del donante, directamente se trasplantan en el receptor (clásicos trasplantes de cornea, piel, hueso, segmentos vasculares, válvulas cardíacas, fascias y tendones, etc); Desarrollo de técnicas de terapia celular que permiten crear nuevos tejidos a partir de la diferenciación celular (células precursoras se diferencian a células más maduras, ya con la forma celular definitiva del tejido a regenerar) o del cultivo y expansión celular (células maduras se extraen del organismo y se cultivan y someten a técnicas de expansión, es decir, se multiplican en el laboratorio). En los casos de diferenciación, como fuente celular se pueden utilizar células madre embrionarias (células troncales totipotentes o pluripotenciales embrionarias) o células madre adultas con diferentes grados de diferenciación: células pluripotenciales, células precursoras de la serie celular de la sangre u otras células precursoras de otras estirpes celulares y combinación de estas técnicas de cultivo, expansión y diferenciación con la utilización de matrices y/o biomoléculas de soporte, lo que se ha denominado ingeniería tisular (Cassileth, 1998).

La utilización de las células como alternativa terapéutica en las patologías humanas está desarrollándose de forma considerable. Actualmente existen múltiples líneas de investigación centradas en este objetivo; tratar pacientes. La mayor parte de los procedimientos de la terapia celular deben considerarse dentro del ámbito experimental. Para que una terapia celular sea considerada como de uso clínico deberá demostrar su eficacia y seguridad (Cassileth, 1998).

La actualización reciente define los medicamentos de terapia celular somática como la utilización en seres humanos de células somáticas vivas, tanto autólogas (procedentes del propio paciente), como alogénicas (de otro ser humano) o xenogénicas (de animales, cuyas

características biológicas han sido alteradas sustancialmente como resultado de su manipulación para obtener un efecto terapéutico, de diagnóstico o preventivo por medios metabólicos, farmacológicos e inmunológicos. Dicha manipulación incluye la expansión o activación de poblaciones celulares autólogas ex vivo (Gage, 1998).

Uno de los mejores efectos clínicos de la Terapia Celular es el retraso del envejecimiento de los tejidos corporales y por consiguiente una mejor salud. La Terapia Celular es la vía directa hacia la revitalización. Las famosas Clínicas de Rejuvenecimiento en Suiza han utilizado por más de cuarenta años esta terapia para revitalizar el organismo, dar nuevas energías y curar o controlar algunas enfermedades, especialmente las crónicas y degenerativas como el cáncer. En México la Terapia Celular se está aplicando desde hace varios años con muy buenos resultados. Las células que se implantan son las mismas usadas en Suiza y otros países de Europa. Son elaboradas en Alemania por los Laboratorios Cytobiofarm GmbH. Es un tratamiento de alta tecnología que no debe considerarse rutinario ni aislado, tiene sus indicaciones precisas y cuando está bien indicado los resultados son excelentes (Parson, 2004).

Por definición es un tratamiento medico-biológico basado en los principios fundamentales de la célula y ejerce su acción terapéutica en los defectos biológicos celulares, mediante la aportación de los elementos orgánicos e inorgánicos que la misma célula utiliza para elaborar sus propias proteínas de acuerdo a su mandato genético. Esto se consigue por el implante vía intramuscular de múltiples micro colgajos provenientes de los distintos tipos de tejidos y órganos fetales o juveniles de origen bovino. El laboratorio alemán Cytobiofarm GmbH, que es el distribuidor más grande de estas células a nivel mundial, las obtiene de tejidos fetales, usualmente de ovejas creadas genéticamente para este fin. Los tejidos celulares seleccionados se suspenden en una solución salina especial. El implante usualmente se aplica en forma subcutánea profunda en la región cuadrante superior de los glúteos (Gage, 1998). No requiere hospitalización, aunque sí es prudente descansar en casa el día del implante. La aplicación es por medio de una inyección implante. Los tejidos celulares seleccionados se suspenden en una solución salina especial. Antes de la aplicación de la Terapia Celular, se hace la historia clínica del paciente y de acuerdo a las deficiencias funcionales que se encuentren, así serán los tejidos celulares a implantar. Si se encuentra deficiencia a nivel gastrointestinal se podría implantar células de: hígado, páncreas, mucosa intestinal e intestino grueso.

Las veces de la aplicación dependen de la deficiencia a corregir. Para una revitalización en la cual se emplea seis tejidos, se puede implantar cada año pero si es para el manejo de cáncer, los implantes pueden ser mensuales. Es necesario hacer cierta preparación ante de implante. Ante todo es indispensable hacer una buena historia clínica del paciente. Asimismo, es conveniente hacer una desintoxicación biológica para que el organismo esté lo más limpio posible para recibir las células a implantar.

La Terapia Celular es muy empleada a nivel mundial por su efectividad histórica. Por ejemplo cuando el Papa Pío XII estaba enfermo y desahuciado, fue llamado el Dr. Paul Niehans para que diera su opinión sobre esta grave situación. El Profesor Niehans estaba usando la Terapia Celular desde 1925. Se indicó Terapia Celular al Papa Pío XII y salió de su gravedad, recuperándose a corto plazo. El Profesor Paul Niehans fue incorporado por el Papa a la Prestigiosa Academia Científica del Vaticano. Desde entonces, a principios de 1950, por este afortunado acontecimiento, la Terapia Celular es muy conocida e indicada en todo el mundo, especialmente en Europa. Con el paso de los años, los adelantos científicos han mejorado la calidad y pureza de los tejidos celulares que actualmente se implantan. Es una terapia que, si está

indicada de acuerdo a la historia clínica del paciente, puede ser empleada a cualquier edad (Gage, 1998).

1.6.2.- BREVE HISTORIA DE LA TERAPIA CELULAR.

El Doctor Paúl Niehans de Suiza fue el creador de la terapia celular en su forma actual, ya que no descubrió nada nuevo pues la terapia celular era practicada en la antigüedad en su forma original. Se encuentra mencionada desde el año 1550 A.C. en una colección de recetas denominada "Papyrus Ebers" del famoso Medico Suizo Paracelsus que vivió en el siglo XVI, viene el lema: "igual se cura con igual", "corazón cura corazón, riñón cura riñón" sobre el cual esta basada la terapia celular y otros métodos de tratamiento como la homeopatía (Gage, 1998).

Hunter (1771) confirmó el efecto regenerativo de la implantación de tejidos de testículos en gallos castrados. Bown-Seguard (1889) informó a la sociedad biológica de Paris sobre los efectos positivos que resultaron de las inyecciones de un preparado de tejido testicular obtenido de cachorros de perro y aplicados sobre su misma persona. En 1927, El cirujano Suizo Paúl Niehans es el primero en realizar un trasplante de tejidos de las células acidofílicas del lóbulo anterior de la glándula pituitaria de un becerro a enanos adolescentes, obteniendo un aumento de hasta 32cms. Práctico con éxito implantes en amenorrea primaria y diabetes. Paúl Niehans (1931) practica el primer implante-inyección de tejido paratifoideo a una paciente con tetano postoperatorio con células obtenidas previamente de una ternera. El éxito obtenido con este paciente condujo a Niehans a abandonar su práctica como cirujano y dedicarse de lleno a la terapia celular (Gage, 1998). En 1931, comenzó Niehans con la implantación de células frescas llamadas vivas, en las cuales se considera intacta la estructura y el contenido bioquímico de las mismas. En 1955 el equipo de Dr. Niehans resuelve el problema de riesgos de las células frescas y la falta de controles analíticos, logrando las células liofilizadas (desechadas), en igualdad de condiciones que las células frescas, es decir con las mismas características morfológicas y bioquímicas intactas de una célula fresca. Niehans como más tarde escribió: "Pensé que el efecto sería de corta duración, al igual que el efecto de una inyección de hormonas, y que yo tenga que repetir la inyección".

En 1958 se funda la Asociación Internacional de Investigación de la Terapia Celular, cuya sede está ubicada en Frankfurt (Alemania), teniendo pleno reconocimiento por la OMS.

Thorne (1967), publicó la versión en inglés y actualización de Niehans "obra original" (de Investigaciones Celulares y terapia celular), que también incluye documentos de investigadores de Alemania, Austria, Grecia y España.

En la década de 1970, en la Universidad de Heidelberg, Dr. Lettre y Schmidt demostraron por radiactivos la inyección de células fetales en el órgano diana, es decir, corazón a corazón, el hígado para el hígado. Este hito de investigación hizo mucho para demostrar que el material celular animal fue transportado por el huésped humano a la sangre homóloga de órganos y tejidos (Gage, 1998).

A fines del decenio de 1980, el doctor Mitchell Golbus, de la Universidad de California en San Francisco, ha intentado sin éxito con el trasplante de tejidos de adultos en los fetos humanos para curar enfermedades genéticas. En 1983, la Asociación Americana para la Parálisis, en un convenio fue informado que las células tomadas de fetos humanos abortados que se inyectan en animales han proporcionado

pruebas de ser útil en la reparación de la médula espinal en pacientes accidentados y enfermedades degenerativas. En enero de 1988, Los Angeles Times informó sobre la labor del Dr Kevin Lafferty (1988), de la Universidad de Colorado Medical Center, que vieron buenos resultados en 6 de 17 pacientes diabéticos tratados con implantes de células de páncreas fetal. El "Times" también informó de que alrededor de 200 pacientes en todo el mundo habían recibido las células de hígado fetal, sobre todo para restablecer la pérdida de médula ósea como resultado de la terapia del cáncer. Por otra parte, Robert P. Gale (1986), de UCLA, ha implantado células de hígado fetal en seis de las víctimas de radiación de la (entonces) Unión Soviética, del desastre nuclear de Chernobyl.

En octubre de 1991 y como seguimiento en febrero de 1992, los investigadores norteamericanos, presentaron con éxito informes sobre los principios de feto-feto-a la terapia celular con una anomalía genética grave, llamado Síndrome de Hurler. Se estableció en 1992, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (International Society for Cellular Therapy) (ISCT) como una sociedad profesional que representa a los científicos y los médicos que trabajan en el ámbito de la manipulación de injerto de las células madre hematopoyéticas. Tiene más de 4100 miembros en representación de todos los principales centros de trasplante de médula ósea de células madre. ISCT ha elaborado el primer borrador de las normas de células hematopoyéticas para la recolección y procesamiento (Gage, 1998).

La American Society for Blood and Marrow Transplantation (ASBMT) se formó en 1993 como una organización profesional que representa los médicos e investigadores que participan en el área clínica en el trasplante de células progenitoras hematopoyéticas. La sociedad tiene más de 1000 miembros predominantemente en los Estados Unidos y Canadá. ASBMT ha desarrollado el primer proyecto de las normas para el trasplante de células hematopoyéticas. En diciembre de 1994, ISCT y ASBMT, fusionaron sus normas en un solo documento que abarca todos los aspectos de la terapia de células hematopoyéticas (recopilación, procesamiento y trasplante). Las dos sociedades de hecho trabajan con el fin de desarrollar un voluntario trabajo de inspección y programación de acreditación sobre la base de las normas comunes (Gage, 1998).

Para reconocer la importancia de desarrollar el consenso del injerto a las normas de transformación, se formó 1994, América del Norte Grupo de Tareas (NATF), consistente de todas las principales organizaciones profesionales interesadas en la terapia de células hematopoyéticas, incluyendo de hecho, ISCT y ASBMT. La primera edición del hecho de Normas fue publicada en septiembre de 1996. Hubo un consenso general sobre las normas en que no debe haber conflicto entre las organizaciones de normalización. La primera edición del hecho de Normas fue publicada en septiembre de 1996. El Programa de Inspección y Acreditación fue desarrollado por el doctor Phyllis Warkentin (1996), el director médico de la Fundación de la Acreditación de Terapia Celular (Foundation of the Accreditation of Cellular Therapy) (FACT). La primera inspección se inició en septiembre de 1997 con los primeros programas de acreditación otorgado en 1998 (Gage, 1998).

En España por ejemplo, en 8 de Noviembre de 2004, tanto el Laboratorio de Terapia Celular y Medicina Regenerativa en Sevilla como el Banco de Células Madre en Granada, las primeras líneas celulares procedentes del Instituto Karolinska de Estocolmo llegaron al Banco de Células Madre de Granada. Este paso abre la puerta al inicio de las investigaciones con células madre en Andalucía. El banco es el primero español y el tercero europeo de carácter público. Las líneas celulares son cultivos de células madre ya establecidos que han mantenido sus propiedades a lo largo de un año

como mínimo. Las células procedentes de Karolinska están estables más de dos años. Se sabe que no tienen aberraciones cromosómicas y que son pluripotenciales, es decir, a partir de las progenitoras celulares embrionarias se pueden obtener otro tipo de células. Andalucía, Valencia y Cataluña son las comunidades involucradas en las investigaciones con células madre embrionarias (Cassileth, 1998).

El gobierno de la Generalitat anunció que para finales de 2005 acabará el edificio del Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona (CMRB). Mientras tanto crearán un banco de líneas celulares en unas dependencias del Parque de Investigación Biomédica de Barcelona que podrá estar funcionando a finales de año. En 23 Marzo de 2005, las terapias celulares son la esencia de algunas de las investigaciones llevadas a cabo en los laboratorios españoles. Como quedó reflejado en el simposio "Del trasplante de órganos a la terapia celular" celebrado a comienzos de marzo muchos de estos trabajos destacan el potencial poder de las células madre para curar determinadas patologías. Por lo general, se trata de ensayos en fases tempranas cuya viabilidad se desconoce (Cassileth, 1998).

1.6.2.1.- HISTORIA DEL INSTITUTO CATÓLICO DE TERAPIA CELULAR

1983: En St Mary's Hospital de la Católica Medical Center, en Corea de Sur, es logrado el primer trasplante alogénico de médula ósea entre hermanos para la leucemia.

1992: Es establecido el Trasplante de la médula ósea en el Centro Católico Médico.

1994: Se creó el Banco de Médula Ósea en el marco del trasplante de la médula ósea.

1999: Se hicieron 1000 casos de trasplante de células madre hematopoyéticas en el St Mary's Hospital.

2002: Tuvo lugar el primer congreso Internacional de la Terapia Celular con células madre en el Instituto Católico.

2003: Se realizaron 2000 casos de trasplante con células madre hematopoyéticas en el St. Mary's Hospital.

2003: Hubo el segundo simposio internacional sobre células madre en el Instituto Católico.

2004: Fue el establecimiento de la comisión para la vida en la Arquidiócesis de Seúl y el Instituto Católico de Terapia Celular (Sylvester y Longaker, 2005).

1.6.2.2.- HISTORIA DE LAS CÉLULAS MADRE

El uso de la medicina de células madre fue utilizado por primera vez en 1956 por el Dr. E. Donnall Thomas, un especialista en trasplante de médula ósea. Administró los donantes de células madre adultas a un paciente con leucemia que entró en remisión completa. Dr. Thomas y Joseph E. Murray son co-ganadores del Premio Nobel 1990 de Fisiología de Medicina por sus contribuciones a los descubrimientos sobre las células y los trasplantes de órganos en el tratamiento de enfermedades humanas.

Células madre de sangre del cordón umbilical se han utilizado en el tratamiento de los cánceres de la sangre y / o enfermedades de la sangre desde 1988. Ese mismo año, Elaine Gluckman sustituye sangre del cordón umbilical para un trasplante alogénico de

médula ósea para tratar la anemia de Fanconi, una rara enfermedad de la sangre recesivo. El infantil sigue siendo completamente libre de la enfermedad. También en 1988 en la Universidad de Wisconsin, James Thomson aisló las primeras células madre embrionarias de un blastocisto de un día de niño de cinco años de huevos fertilizados in vitro. Este descubrimiento provocó una multitud de estudios científicos, documentos de investigación, y acalorados debates sobre las cuestiones éticas en torno a la destrucción de embriones para fines médicos. En 2001, se elaboraron protocolos de tratamiento que permite la eliminación de las células blancas de la sangre del cordón umbilical, lo que hace el tratamiento seguro, sin riesgo de injerto versus huésped (Garrido, 2003).

Catherine Verfaillie (2002) de la Universidad de Minnesota demostró que las células madre CD34+ de médula ósea podrían repoblar todas las células de un ratón en desarrollo. Este estudio le pide más estudios con células madre adultas para generar mucho más que sólo las células de la sangre. Quedó probado que hay un gran potencial para las células madre adultas para tratar una amplia gama de enfermedades de la sangre, cáncer, enfermedades degenerativas y lesiones. Los estudios fueron liberados más tarde y demostraron que las células madre adultas tienen el poder para reconstruir todas las células del cuerpo, no sólo las células de la sangre (Garrido, 2003).

En 2004, la Universidad de Duke publicó datos de un estudio en humanos y confirma el estudio de Verfaillie. En el estudio aparece el tratamiento del corazón de un niño que recibió células madre CD34 + derivadas de donaciones de sangre de cordón umbilical (Sylvester y Longaker, 2005). No sólo la investigación muestra la diferenciación de las neuronas y otros tipos de células, sino también demostró que las células madre de la sangre del cordón umbilical:

- Migran a la localización de la enfermedad,
- Tienen la capacidad de diferenciarse en células especializadas del corazón e injertan la obtención de beneficios clínicos.

1.6.3.- LAS CÉLULAS DEL CORDÓN UMBILICAL PUEDEN SER ÚTILES EN EL TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA.

Las células sanguíneas del cordón umbilical obtenidas en el momento del nacimiento contienen células madre no diferenciadas. Estas células se almacenan en bancos de sangre especiales en todo el mundo para que posteriormente se puedan utilizar en tratamientos de trastornos sanguíneos como la leucemia. Uno de los estudios examinó la capacidad de estas células para tratar una amplia gama de enfermedades, incluidas las de origen infeccioso y genético. Las principales modificaciones del saber y de las evoluciones técnicas, las cuales aumentan las capacidades de acción en biología y recurren a la idea de que se hace del hombre, se sitúan, por una parte, en el dominio de la genética y, por otra parte, en el de la embriología y de la terapia celular. Si se suele tener mezclar ambos ejes del saber, son para el profesional que lleva a cabo estas investigaciones, ejes destacadamente diferentes, aunque algunos de los problemas éticos originados por ellos se sitúan en la convergencia entre esas técnicas y competencias. Se empieza, por lo tanto, a discutir de la modificación de las posibilidades medicas, tanto como sobre las interrogaciones que crean los progresos realizados en el conocimiento del programa genético del ser humano gracias al programa genoma que le es consagrado (Kawano et al., 1998).

1.6.4.- LA TERAPIA CELULAR Y LA INVESTIGACIÓN SOBRE EL EMBRIÓN

Se habla, entre los grandes progresos médicos de mañana, por una parte, de las repercusiones de la genética, del desciframiento de los genomas; por otra parte, de la medicina regeneradora. Ahí se trata del concepto de una medicina que escogería como objetivo curar numerosas enfermedades, particularmente vinculadas al que células mayores tengan funciones alteradas o degeneradas, por células jóvenes, totalmente funcionales, toleradas por la persona curada. En principio, estas células podrían proceder de dos fuentes: del embrión y de los tejidos diferenciados (Carella et al., 1998).

En todos los tejidos diferenciados, que se trate de un recién nacido, de un feto o de un adulto, aun bastante mayor, persisten, en el corazón de los tejidos, células que son capaces de regenerarlos. Desde ya tres o cuatro años, se sabe que en realidad estas células regeneradoras hacen más que reparar sencillamente los tejidos a los que pertenecen. Así, una célula progenitora de la piel puede no sólo estar al origen de piel sino también de neuronas, gracias a las que en el futuro se podría quizás tratar enfermedades neurodegenerativas, tales como la enfermedad de Parkinson o de Alzheimer. En la médula ósea, se encuentran células capaces de reparar la sangre fabricando glóbulos rojos y glóbulos blancos, tanto como células que podrían regenerar corazón, hueso, tendones, hígado, tejidos nerviosos y quizás de cualquier otro tipo (Carella et al., 1998; Khouri et al., 1998). Por supuesto queda aún mucho trabajo que hacer para transformar esa posibilidad teórica en realidad terapéutica pero ya existe ahí una auténtica esperanza, tanto más cuanto que ningún problema ético se plantea aquí.

La segunda fuente de células: los embriones. Los embriones de mamíferos, cualesquiera que sean, se desarrollan hasta una estadio en la que tienen la forma de una cavidad hueca en el centro de la cual se encuentra un pequeño cúmulo de células llamada masa celular interna, a expensas de la cual el embrión propiamente dicho se desarrollará. El resto del huevo participará a la formación de la placenta y de las membranas. Si se sacan, destruyendo el embrión, estas células madre embrionarias, son capaces de multiplicarlas y cultivarlas durante mucho tiempo. Sin embargo, en algunas condiciones de cultura esas células son capaces de dar todos los tejidos del organismo. Pueden transformarse en células secretoras de insulina que podrían curar a un diabético; en células secretoras de dopamina cuyo trasplante se indicaría para mejorar a personas atacadas por la enfermedad de Parkinson; en células del corazón con el potencial de reforzar un corazón debilitado por un infarto de miocardio, etc. De modo que ahora se llevan investigaciones paralelas para tratar de transformar estas posibilidades en realidades (Carella et al., 1998; Khouri et al., 1998). Queda aún mucho trabajo por hacer con una u otra de esas estrategias. Las células madre llamadas adultas son probablemente poco numerosas, no se sabe muy bien reconocerlas, a veces son difíciles de cultivar y su nombre podría menguar con la edad. En cuanto a las células madre embrionarias tienden, cuando no son diferenciadas, a provocar un tipo de cáncer, un teratoma. El trasplante de tales células embrionarias indiferenciadas a una persona, no sólo no la curará, sino que provocará la aparición de un tumor embrionario. Por lo demás, se dista aún mucho de saber controlar, según la enfermedad que se trata de curar, la diferenciación en masa de las células embrionarias en un tipo dado de células *secretando por ejemplo insulina para el diabético, en cardiomeiosis para el infarto de miocardio, en neuronas dopaminaenergicas para la enfermedad de parkinson, etc.*

1.6.5.- EL CLONAJE O LA CLONACIÓN TERAPÉUTICA

La fabricación de embriones humanos por clonación podría tener dos indicaciones, dos finalidades, la primera terapéutica y la segunda reproductora. En aquel caso, se trata de obtener células embrionarias idénticas al nivel genético y probablemente pues inmunológico a las de un enfermo a la espera de trasplantes celulares para una gran diversidad de enfermos: afecciones neurodegenerativas tales como las enfermedades de Parkinson o de Alzheimer, cánceres, diabetes, insuficiencia hepatocelular, quemaduras etc. La realización de un programa tal necesitaría por parte de los biólogos un dominio preciso de la diferenciación de células troncales aisladas de un embrión clon. En el futuro, una persona atacada por una enfermedad de Parkinson o por una diabetes pediría a su esposa, a su hija, una donación de ovocitos o los obtendría por parte de donantes remuneradas o no (Shortman y Caux, 1997). El médico reemplazaría el núcleo de esos óvulos por el de una célula cualquiera de la persona que curar y cultivaría el embrión clonado, creado así durante seis o siete días en las condiciones del laboratorio hasta su transformación en blastocitos. En este estadio, las células de la masa celular interna constituyen, los precursores del feto propiamente dicho. Ahí se sitúa el origen de las células madre embrionarias. Si es posible mandarles que se diferencien, al actuar sobre las condiciones de cultivo, en células del cerebro o del páncreas, se podría pues trasplantarlas al enfermo para tratar su enfermedad de Parkinson o su diabetes. En principio, el éxito del trasplante debería ser perfecto ya que las células trasplantadas serán esencialmente idénticas a las de la persona receptora.

Es de notar que la descripción que acaba de hacerse de un protocolo de clonación con objetivo terapéutico en el hombre queda hasta hoy muy académico. En efecto, varios grupos de investigaciones trataron de reproducir la clonación por transferencia nuclear en primates no humanos (monos macacos rhesus), pero sin éxito. Según algunos resultados comunicados por periodistas científicos, los embriones clonados ya obtenidos degeneran muy rápidamente, después de algunas divisiones solamente; a su nivel se acumulan anomalías cromosómicas cuya causa no se entiende. Estos resultados negativos hacen muy improbable el éxito de eventuales intentos de clonación humana, si se realizaban hoy. Se reafirmó ese análisis a fines del mes de noviembre de 2001 por el muy mediático anuncio según el cual la sociedad americana de Advanced cell Technology (Tecnología de Célula Avanzada) se había adelantado en la puesta a punto de las técnicas de clonación con objetivo terapéutico (Shortman y Caux, 1997). Si se repara más en los detalles (The Journal of Regenerative Medicine del 25 de noviembre, una publicación en línea en Internet), la transferencia de los núcleos de fibroblastos dentro de los ovocitos humanos seguía siendo un fracaso mientras que la inyección de células ováricas del cúmulo permitía dos de cada 71 tentativas obtener embriones de cuatro células y una vez un embrión de 6 células. En todos los casos, el desarrollo de estos embriones era espontáneamente abortivo en 24 horas o menos. Cuando se recuerda que las células madre embrionarias se ven aisladas de un blastocito, a saber en un estadio del desarrollo que corresponde al sexto o séptimo día después de la fecundación, o sea a más de cien células, se realiza lo lejos que esta de obtener un embrión humano que se puede utilizar para la clonación humana, que sea terapéutica o reproductiva (Shortman y Caux, 1997).

Sin embargo, corre el rumor en los medios especializados de que investigadores chinos habrían conseguido, de manera reproducible, embriones humanos clonados y susceptibles de desarrollarse hasta el estadio de blastocitos y ser pues la fuente de

células madre embrionarias. Si es exacta esa noticia, el método sería sin duda alguna el objeto de una publicación científica y podría entonces ser utilizado en el mundo entero por investigadores especializados. Ahora bien, la técnica de obtención de los embriones humanos clonados es indispensable para quien quiera que nazcan bebés clonados tanto como para los terapeutas celulares que soñarían con tener a su disposición células (madre embrionarias) inmunocompatibles. Este aspecto de la cuestión aparece por supuesto como crucial hoy cuando se multiplican las declaraciones de que se tiene la intención de realizar una clonación reproductiva humana (Hart, 1997).

Otra preocupación tiene relación con los riesgos de instrumentalización suplementaria del cuerpo femenino a los que no dejaría de llevar una amplia utilización de la clonación terapéutica. En efecto, los equipos privados o públicos que realizan esas experiencias deberían entonces disponer de una importante cantidad de óvulos humanos. Hoy, una o dos centenas de óvulos serían necesarios para cada intento. Puesto que la demanda crea ineluctablemente un mercado, por lo menos en numerosos países, bien se imagina pues que se enrolarían en gran número mujeres necesitadas para constituir cohortes de donantes de óvulos remuneradas. Aceptarían, por contrato, prestarse a estimulaciones ováricas repetidas y acompañadas por el control sanitario necesario a la verificación de la calidad de las productoras y de su producción (Hart, 1997).

Además, algunos se preguntan a propósito del respeto debido a la singularidad del embrión humano como eventuales premisas de una persona. Para numerosos creyentes, por ejemplo, la creación de embriones humanos con el objetivo de destruirlos para que se pueda aislar herramientas de investigación o poblaciones celulares con vocación terapéutica, estaría en contradicción con su singularidad respetable. Sin entrar, en toda lógica, no hubiera debido desembocar en la guerra de trincheras a la que se asiste por el mundo entre los partidarios y los adversarios, unos y otros encarnizados, de la clonación terapéutica. En efecto, la realidad de las perspectivas terapéuticas presentadas es finalmente muy incierta. Una técnica que exige, para cada enfermo al que se asiste, disponer centenas de óvulos de mujeres y clonar embriones humanos con fin de tratar de poner en cultivo células potencialmente cancerígenas y cuya eficacia queda por demostrar, no justifica las promesas que se le han concedido con complacencia. En efecto, aun más allá de las preocupaciones éticas y de los obstáculos técnicos y científicos persistentes, se tiene aquí el ejemplo típico de un enfoque algo exótico tan costoso y exigente respecto al tiempo y a la plantilla que necesita que no se ve cómo, aun en el mejor de los casos, podría constituir la base del tratamiento que esperan decenas de millones de personas (Lanzavecchia, 1996).

Hoy en cambio, la importancia de las objeciones a la fabricación de embriones humanos procedente de la clonación no se parece compensada por la realidad de las esperanzas terapéuticas basándose en su uso, ni por la urgencia de la investigación. Al parecer el movimiento que se fortalece hoy para autorizar sin embargo la clonación terapéutica proviene de dos fuerzas. La primera es la impaciencia de los investigadores por que le permitan el acceso a nuevos materiales de estudio, sobre todo cuando son prometedores en términos de celebridad o más bien de eficacia médica. La segunda es la referencia al valor supremo del progreso, concebido por sí mismo como comisionado de esperanzas, incluso la certeza de mejoría de la condición humana.

Sin embargo, el siglo XX que acaba de terminarse, brillante en todos los sentidos del término, el que se refiere a las luces del espíritu tanto como las de los hornos crematorios, bien ilustra la ambivalencia del poder conferido al hombre por el progreso de los saberes y de las técnicas. La libertad humana implica la posibilidad del bien o del mal, y por consiguiente, la utilización del progreso en beneficio del uno o del otro.

Desde luego, no por ser eventualmente posible, resulta bien. Si al menos si fuera capaz de justificar en qué una innovación propuesta, cuyo objeto es el hombre, es mejorar su condición respetando al mismo tiempo los principios morales que fundamentan su dignidad y su autonomía. De todos modos, esto no es el caso hasta hoy de la clonación terapéutica (Garrido, 2003).

Se ha querido bosquejar un amplio cuadro de la progresión de las posibilidades médicas en genética y terapia celular. La ciencia en sí misma tiene como finalidad el acercarse a la veracidad de los fenómenos: desemboca en la puesta a punto de técnicas y evalúa expertamente sus efectos. Sin embargo, la ciencia en sí misma no debería tener la pretensión de determinar lo que conviene hacer y de todas formas no tiene la posibilidad para ello. Preguntarse sobre la utilización de un poder otorgado por el conocimiento es inevitable respecto a un ser que se reivindica como ser libre. Ahora bien, esa libertad implica que el uso de todo poder humano pueda hacerse en provecho o en detrimento de los demás. De lo que se está hablando es exactamente eso: ¿cómo asumir colectivamente las nuevas responsabilidades que se tocan debido al desarrollo de las ciencias y de las técnicas y por lo tanto al aumento de nuestro poder?

1.6.6.- PREGUNTAS SOBRE LAS CÉLULAS MADRE

¿Por qué hay tanta controversia alrededor de ellas?

Los científicos dicen que las células madre prometen revolucionar la medicina. Se espera que estas células puedan ser usadas en trasplantes para reparar el tejido dañado y órganos como el corazón, pulmones, músculos e incluso el cerebro. Muchas enfermedades pueden ser curadas en este proceso, tales como la diabetes, el Parkinson y enfermedades crónicas del corazón, cáncer etc., (Van der Kooy y Weiss, 2000).

¿Por qué no se puede usar las células madre de un adulto en lugar de aquellas que provienen de los embriones?

Los investigadores creen que las células madre de un adulto son capaces de desarrollar sólo un rango restringido de tejidos específicos. Las células madre de la médula ósea se convierten en células sanguíneas maduras, mientras que las células madre tomadas de un embrión de 6 días pueden llegar a ser cualquier tipo de tejido. Sin embargo, aún se tiene que hacer una comparación científica de los dos tipos de células madre, ya que algunos trabajos con células de adultos han indicado que éstas tienen un sorprendente potencial para crecer en una gran variedad de distintos tipos de tejidos (Rosentha, 2003).

¿Cuál es el uso de las células madre derivadas de la sangre del cordón umbilical?

Éstas han probado ser invaluableles en el tratamiento de desórdenes hereditarios en la sangre en niños y pronto podrían probar más versatilidad que una célula madre de adulto, pero probablemente no sean tan potentes como las células embrionarias (Rosentha, 2003).

¿Qué es lo que tiene que ver la clonación con las células madre?

Si las células madre provenientes de embriones producen los beneficios médicos esperados, el rechazo de los tejidos siempre limitará su uso en los trasplantes. Una vía para este problema es usar células madre de un embrión clonado de una célula de tejido del mismo paciente (Van der Kooy y Weiss, 2000).

¿Una compañía estadounidense anunció recientemente que había clonado un embrión humano?

Así fue, pero el embrión detuvo su desarrollo antes de que las células madre pudieran ser extraídas, por lo que no es seguro si este "clon" fue genuino o un artefacto experimental (Rosentha, 2003).

¿Limitaciones éticas?

¿Pero qué son las células madre? ¿Cuáles son realmente sus posibilidades terapéuticas? ¿Es lícito el uso de embriones humanos para obtenerlas? ¿Son éstos los únicos proveedores? Las células madre suscitan sueños y pesadillas. Para empezar, no resulta fácil definir qué es una célula madre. Para los profanos, la idea más importante es que estas células están indiferenciadas, es decir, que todavía no se han especializado; que pueden auto renovarse y que, ante determinadas señales aún poco conocidas, se especializan para realizar una función concreta. Este concepto se aplica en muchas situaciones en medicina y biología. Por ejemplo, los tumores nacen de una única célula madre que, en muchos procesos cancerosos, da origen a diferentes tipos celulares. Un ejemplo extremo de este fenómeno es un tipo de cáncer testicular conocido como teratoma o teratocarcinoma. En ratones, los científicos pueden provocar este tumor simplemente tomando un puñado de células testiculares normales y cambiándolas de lugar. Esta capacidad transformista surge en el mismo huevo fecundado o cigoto. Los biólogos dicen de éste que es una célula madre totipotencial, ya que da origen a todas las células que integran el organismo, incluidas aquellas que no forman parte del embrión, como es el caso de la placenta. Sin embargo, durante el desarrollo embrionario, la capacidad de las células madre para diferenciarse queda, poco a poco, limitada. Por ejemplo, las células madre del cerebro dan lugar en último extremo a los diferentes tipos de neuronas y células no neuronales del sistema nervioso (Van der Kooy y Weiss, 2000).

¿Eficaces contra la leucemia?

Estudios en ratones indican que es precisamente en las primeras etapas del crecimiento embrionario cuando surge un tipo de células madre llamadas ES, que son capaces de diferenciarse en una gran variedad de estirpes celulares. Las ES pueden ser extraídas y cultivadas en laboratorio. Los científicos han comprobado que, cuando éstas son devueltas a un embrión, contribuyen activamente en la formación de todos los tejidos, incluidos los de la línea germinal. Los expertos denominan a estas células pluripotenciales. En las fases tardías del desarrollo hacen acto de presencia otro tipo de células madre llamadas stem cells germinales o EG, que también son pluripotenciales. Pero las investigaciones en este sentido han avanzado muy lentamente, debido principalmente a los obstáculos bioéticos. Una vía alternativa para sortearlos podría venir de las células madre que persisten en los adultos. Desde hace tiempo, los oncólogos utilizan las células madre hematopoyéticas, que se localizan en el tejido

sanguíneo, para el trasplante de médula ósea, una terapia para combatir eficazmente la leucemia (Van der Kooy y Weiss, 2000).

¿También entrañan riesgos?

Recientemente, los científicos descubrieron la existencia de células madre al menos en dos regiones concretas del cerebro adulto. Se refiere al hipocampo y el bulbo olfativo.

Cultivadas en el laboratorio, estas células pluripotenciales pueden diferenciarse fácilmente en distintos tipos de células nerviosas neuronales: astrositos, oligodendrocitos, microglías y endoteliales. Esta línea de investigación supone una prometedora esperanza para el tratamiento de las lesiones medulares, esclerosis múltiple y las enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer y el Parkinson. Así es, el cultivo de células madre embrionarias podría generar los oligodendrocitos que necesitan los pacientes afectados por esclerosis o las neuronas que mueren en el cerebro de los enfermos de Parkinson (Van der Kooy y Weiss, 2000).

El potencial terapéutico de las células madre es sobrecogedor. Sin ir más lejos, se ha visto que las células madre extraídas del cordón umbilical podrían utilizarse para reparar las lesiones neurológicas causadas por el infarto cerebral. Los ensayos en ratas resultaron todo un éxito. Ahora habrá que ver si esta terapia celular funciona en humanos (Van der Kooy y Weiss, 2000).

Como ya se ha mencionado, la ciencia sabe muy poco sobre las células madre humanas. Su uso terapéutico no está exento de peligros: las ES de ratón son tumorigénicas, pues se transforman en teratoma, un tumor epitelial, cuando se inyectan en un ejemplar adulto.

¿Ocurre lo mismo en humanos? Es más, ¿podrán los científicos forzar a nuestras ES a diferenciarse en la estirpe deseada? ¿Conseguirán que todas las células madre de un cultivo se diferencien en células pulmonares o renales? El tiempo lo dirá.

1.6.7.- INGENIERÍA DE LAS CÉLULAS MADRE

1.6.7.1.- GENERALIDADES

La ingeniería de las células madre (SC) es una tecnología aplicable en la solución de problemas de salud del ser humano relacionados con la reconstrucción de tejidos y la restauración de la función celular normal en enfermedades metabólicas, hematológica, inmunológicas y degenerativas. La investigación en la biología de la SC ha permitido definirle una identidad y establecer un grupo de células de diferente origen que comparten las características de autorrenovación y plasticidad. Este grupo incluye células embrionarias, mesenquimatosas, hematopoyéticas, umbilicales y residentes en tejidos como las SC neuronales (Rosenthal, 2003).

La investigación sobre todo con células embrionarias y los procedimientos de clonación reproductiva y trasplante de núcleos han generado un debate ético, político y religioso, en el cual solamente se puede establecer una opinión si se conocen los conceptos básicos de la biología e ingeniería de las células madre (Blau et al., 2001).

La restauración de tejidos en los seres humanos requiere del reclutamiento y proliferación de células capaces de devolverles forma y función. Las células involucradas en la regeneración recuerdan todo el proceso de desarrollo que llevó a la

formación original del tejido. El concepto inicial, de que poblaciones de células indiferenciadas, autorrenovables y progenitoras, regeneran solamente el órgano en que residen, ha sido sustituido por el de células multipotentes, que pueden ser aisladas de diferentes tejidos en el ser humano. A este grupo de células se le conoce como Células Madre (SC), se originan de tejido embrionario o de tejidos diferenciados y se caracterizan por su capacidad de autorrenovarse y por su pluripotencialidad o capacidad de diferenciarse en diferentes tipos de progenitores maduros (Rosenthal, 2003; Garrido, 2003; Sylvester y Longaker, 2005; Blau et al., 2001).

Una SC debe ser clonogénica: capaz de autorrenovarse ilimitadamente por medio de división simétrica. Debe ser capaz de división asimétrica: dando origen a una célula hija igual a la madre y a otra capaz de originar varios tipos de células diferenciadas de los tres tipos embrionarios (ectodermo, mesodermo y endodermo). Debe originarse de una célula embrionaria o de una SC adulta (Rosenthal, 2003; Garrido, 2003; Blau et al., 2001; Van der Kooy y Weiss, 2000).

La pluripotencialidad fue descrita inicialmente en las células madre embrionarias (ESC o CME) cuando se demostró su diferenciación hacia endodermo, ectodermo y mesodermo (Sylvester y Longaker, 2005; Evans y Kaufman, 1981; Thomson et al., 1998). Células procedentes de médula ósea adulta, cordón umbilical y endotelio muestran capacidad de diferenciación y han permitido ampliar el espectro de tipos de SC con potencial de aplicación clínica en el tratamiento de diferentes patologías del ser humano. Las SC se pueden dividir por su origen en embrionarias y somáticas posnatales (Sylvester y Longaker, 2004).

1.6.7.2.- CONCEPTOS Y PROCEDIMIENTOS

Para la comprensión de la biología e ingeniería de la SC es necesario tener claro los conceptos y procedimientos que se involucran. Transferencia de núcleos, se conoce también como clonación nuclear o trasplante nuclear. Es la tecnología que creó a la oveja Dolly en 1997, el primer mamífero clonado. El experimento demostró que el ADN se conserva durante el desarrollo de organismos multicelulares, que existe la posibilidad de la aplicación de esta tecnología en la regeneración de tejidos y órganos y en la recapitulación celular a partir de células somáticas posnatales y que es posible la creación de CME autólogas (Sylvester y Longaker, 2004; Wilmut et al., 1997).

La transferencia de núcleos es un procedimiento en el que el núcleo de una célula somática pos-mitótica (célula adulta) se inyecta en un oocito no fertilizado al que se ha despojado de su núcleo. Se crea un blastocisto (embrión clonado) que puede ser transferido para su desarrollo al útero de una madre adoptiva donde crece una progenie, que es un clon de la célula adulta donadora. El proceso se identifica como donación reproductiva. También se puede separar la masa de células internas del blastocisto, de la cual se derivan CME indiferenciadas, que se inducen a diferenciación y propagación de las células de un tejido específico, en el proceso conocido como clonación terapéutica o terapia con trasplante nuclear. Las células obtenidas son genéticamente idénticas al donador (Sylvester y Longaker, 2004; Hochedlinger y Jaenisch, 2003; Lisker, 2003).

Un experimento que demuestra la factibilidad de esta tecnología es el tratamiento de ratones con Inmunodeficiencia Combinada Grave (SCID Rag2), con células derivadas de transferencia nuclear y que permiten la corrección genética y fenotípica de la enfermedad (Rideout et al., 2002).

La clonación reproductiva es aún un proceso ineficiente que produce la pérdida de la mayoría de los clones durante la etapa de desarrollo. Para lograr desarrollarse, el clon debe activar genes que regulan el desarrollo embrionario temprano y suprimir genes asociados con diferenciación de la célula donadora original. Debe darse una reprogramación del núcleo donado, que cuando es inadecuada, causa la pérdida del clon. Los errores de reprogramación no afectan la clonación terapéutica (Sylvester y Longaker, 2004; Hochedlinger y Jaenisch, 2003; Rideout et al., 2002; Gurdon et al., 2003).

1.6.7.3.- TERAPIA CON GENES.

Es un procedimiento en el cual se trata de curar una enfermedad, en la que se ha identificado como causa la mutación de un gen. Tiene como objetivo restaurar, modificar o mejorar la función de una célula a través de la introducción de un gen sano. El gen sano se integra en un vector, usualmente un virus, que infecta las células del paciente. Al activarse el gen sano restituye la función de la célula dañada. Se han diseñado dos formas de introducir el material genético, una *in vivo* por medio de la cual, un vector transporta el ADN, que se integra en el genoma de la célula blanco y expresa el gen de interés terapéutico. El otro método, *ex vivo*, transfiere el gen a células en cultivo y luego se trasplantan las células modificadas al tejido blanco (Selkirk, 2004).

Una de las aplicaciones de esta metodología en el ser humano, es la corrección del defecto genético en niños con SCID-X1 y en casos de SCID producidos por deficiencia de adenosina diaminas (ADA) (Cavazzana-Calvo et al., 2000; Hacein-Bey-Abina et al., 2002; Aiuti et al., 2002; Nathwani et al., 2005). El entusiasmo inicial por la terapia con genes, ha disminuido como consecuencia de los malos resultados de los estudios clínicos y los efectos adversos provocados por la respuesta inmune contra el vector (Nathwani et al., 2005). Recientemente se reportó la generación de leucemia de células T en niños tratados por SCID, como consecuencia de la inserción del vector en el locus del gen LOM-2 (Nathwani et al., 2005; Hacein-Bey-Abina et al., 2003). Este gen codifica un factor de transcripción necesario para la hematopoyesis normal, pero que cuando se expresa en forma aberrante se asocia con leucemia infantil (McCormack y Rabbitts, 2004).

1.6.7.3.1.- PLASTICIDAD.

Es la característica que se identifica en una célula que, comprometida con la generación de un tejido específico, se puede diferenciar en células de otros tejidos para los cuales no estaba predeterminada. Esta definición tiene implícito el concepto de la existencia de SC con una línea de maduración no determinada que tienen la capacidad de diferenciarse en tejidos diferentes, dependiendo del patrón a que las induzcan los factores de su microambiente (Rosenthal, 2003; Sylvester y Longaker, 2005; Blau et al., 2001; Horwitz, 2003; Krause et al., 2001).

1.6.7.3.2.- TRANSDIFERENCIACIÓN.

Cambios de linaje o de diferenciación restringida de la SC, ocurren cuando una SC adulta cambia su diferenciación esperada a una que produce células adultas diferenciadas de un órgano diferente. Este proceso ha aumentado las expectativas del uso de HSC en aplicaciones clínicas que van más allá de la reconstitución hematológica o inmunológica. Transdiferenciación es el proceso que explica como SC adultas tejido-

específicas pueden generar células de otros tejidos (Sylvester y Longaker, 2004; Wurmser y Gage, 2002).

1.6.7.3.3.- FUSIÓN.

Algunos tipos celulares son capaces de fusionarse con células de otro linaje y de adoptar la forma y función de las células con las que se fusionaron. Se ha identificado transdiferenciación que tiene origen en el donador, en la cual células de BM transplantadas cambian a líneas celulares que incluyen miocitos, hepatocitos y neuronas entre otras. Este fenómeno se explica por fusión celular espontánea, después de la cual, las células adoptan el fenotipo de la célula receptora. Este proceso puede explicar muchos de los reportes de transdiferenciación (Rosenthal, 2003; Terada et al., 2002; Ying et al., 2002).

1.6.7.4.- FENOTIPO DE LAS CÉLULAS MADRE

Las SC deben ser aislables, homogéneas por purificación y bien caracterizadas antes de que se utilicen para realizar experimentos *in vivo*. Cuando la célula se anida en un tejido, debe desarrollar una función específica demostrable del tejido en el que se aloja (Garrido, 2003; Blau et al., 2001).

La SC debe ser capaz de división celular asimétrica, que produzca una replica idéntica de la SC y una célula que pueda desarrollar una función más especializada. La producción de células que se diferencian provoca la pérdida de la población fundadora (Garrido, 2003; Blau et al., 2001).

Las SC pueden ser aisladas en diferentes tejidos identificando características físicas e inmunofenotípicas. Utilizando marcadores de superficie en las SC, con citometría de flujo y detectando la emisión de fluorescencia con tinciones específicas, se pueden identificar diferentes poblaciones de SC (Blau et al., 2001). Las células madre hematopoyéticas (HSC) humanas se caracterizan por su alta expresión de CD34, intermedia de c-kit y Thy-1 y baja o ninguna de CD38, HLA-DR, CD45RA y CD71. También expresan niveles altos de glicoproteína P (P-gp). Otros marcadores identifican células más primitivas como las CD34⁻ precursoras de la HSC CD34⁺ y los grupos celulares que expresan KDR. Entre 0,1 a 0,5% de las CMH CD34⁺ en la MO, CU y SP de los seres humanos expresan el receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGFR2 o KDR), lo cual permite especular que los fenotipos CD34-KDR⁺ y CD34⁺KDR⁺ corresponden al hemangioblasto postnatal y prenatal, la célula progenitora de los linajes sanguíneo y endotelial, con lo cual se establece una conexión entre angiogenesis y hematopoyesis (Garrido, 2003; Szilvassy, 2003; Baron et al., 2003; Mayani y Lansdorp, 1998; Wognum et al., 2003; Cohen y Nagier, 2004; Mayani et al., 2003).

Una población celular que corresponde al 0,05% de la población celular de la MO y que emite fluorescencia con la tinción Hoechst 33342, se ha denominado como población SP ("side population") y tiene un fenotipo similar a la CM adulta de la MO, pero con gran potencial de diferenciación e integración en otros órganos (Garrido, 2003). Un 20% de la población de células SP, expresan Endoglobina (receptor del factor de transformación del crecimiento e intervienen en el desarrollo de vasos sanguíneos y

del corazón del embrión (Garrido, 2003; Szilvassy, 2003; Baron et al., 2003). La población de células SP en el pulmón embrionario está compuesta por progenitores hematológicos y no hematológicos y son parte de la formación de la vasculatura pulmonar (Summer et al., 2005).

1.6.7.5.- TIPOS DE CÉLULAS MADRE

1.6.7.5.1.- EMBRIONARIAS.

Son células que se pueden derivar de los blastocistos durante la gastrulación. Separadas del blastocisto se pueden mantener indiferenciadas, formando cuerpos embrionarios de los que se pueden desarrollar líneas celulares embrionarias tempranas, con capacidad ilimitada de autorrenovación y capacidad de diferenciación. Tienen el potencial de originar todas las células somáticas y germinales de un individuo completo y son los progenitores de las tres capas embrionarias germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo (Sylvester y Longaker, 2004; Hwang et al., 2004; Cowan et al., 2004; Phimister y Drazen, 2004).

A pesar de su potencial, es necesaria la identificación de muchos mecanismos relacionados con la regulación de su crecimiento y diferenciación, el desarrollo de teratomas y la discusión amplia de los aspectos éticos sobre su uso, antes de que se desarrolle una aplicación clínica (Rosenthal, 2003; Blau et al., 2001; Van der Kooy y Weiss, 2000)

Dentro de la controversia por el uso de material obtenido de fetos, se debe distinguir entre CME y tejidos fetales. Las CME se derivan de la capa interior de los embriones y los tejidos fetales se obtienen de productos de abortos. El tejido fetal ha tenido un uso en terapia e investigación, menos restringido (Tuch et al., 2003).

La CME es la que más controversia ética, religiosa y política ha provocado. En su contra se argumenta que su uso requiere la destrucción de embriones humanos y que la investigación en el tema abre las puertas para procesos más controversiales como clonación, criaderos de embriones y uso de fetos como fuente de tejidos (Phimister et al., 2004; Landry y Zucker, 2004).

El aceptar o no que la adquisición del alma ocurre al momento de la concepción, y por ende todo embrión es un ser humano, lleva a considerar que la destrucción de embriones humanos en proyectos de investigación con CME es equivalente a matar seres humanos (Sandel, 2004; McHugh, 2004).

El descubrimiento de CM en la médula ósea y en el cordón umbilical, plantea la posibilidad de obtener células pluripotenciales, sin tener que recurrir al uso de embriones (Kiessling y Eggs, 2005). También se puede evitar el uso de embriones por medio de la transferencia de núcleos de células somáticas (Kiessling y Eggs, 2005). Otra opción al uso de embriones, es utilizar óvulos no fertilizados a los cuales se induce a partenogénesis (McHugh, 2004).

Una línea de investigación que aportaría una opción a en la discusión sobre el uso de embriones, en la cual los argumentos principales son: "Los embriones humanos no deben ser destruidos en el proceso de crear células madre" y que "investigación que produce un gran beneficio, no se justifica si se debe pagar como precio el violar derechos humanos fundamentales", es la que trata de identificar cuales embriones han perdido la capacidad, en el estadio de 4 a 8 células, de mantener una división celular continua e integrada, crecer y diferenciarse. Con la identificación de esta condición, se

puede determinar la muerte funcional del embrión, aunque no así de cada una de sus células y es posible establecer una posición ética semejante a la de la declaración de muerte cerebral que indica el fin de la vida por consenso y que permite el uso de órganos funcionales para trasplantes (Landry y Zucker, 2004).

Alrededor de 60% de los embriones utilizados para fertilización *in vitro*, no cumplen con los criterios de viabilidad y son rechazados para transferencia uterina. No viable significa incapacidad para desarrollarse hasta el nacimiento. Este concepto defiende del de embrión muerto, pero sin embargo indica la posibilidad de tener criterios de consenso, que a nivel embrionario, definan embriones que se pueden declarar muertos. Estos embriones muertos mantienen grupos de células viables para obtener CME, utilizables en investigación y terapia (Thomson et al., 1998; Landry y Zucker, 2004).

1.6.7.5.2.- SOMÁTICAS POS-NATALES.

Son una fuente de células pluripotenciales, se conoce su existencia como células madre específicas de algunos tejidos, con la función de ser progenitores de las células especializadas en cada tejido. Representan un grupo heterogéneo de células que incluye las de las criptas del intestino, las ovas hepáticas y las hematopoyéticas, dando origen al concepto de células madre adultas específicas de los tejidos. Estos tipos de células se consideraban con diferenciación irreversible, sin embargo se ha demostrado que pueden generar otras líneas de diferenciación en tejidos en los que no residen (Gurdon et al., 2003). Es el ejemplo de las CMH que pueden diferenciarse en neuronas, hepatocitos, miocardio y músculo esquelético, a pesar de que residen en la médula ósea.

Hematopoyéticas: se les define por sus características funcionales de regenerar y mantener todas las células mieloides y linfoides maduras que se encuentran en sangre periférica, médula ósea, bazo y timo (Blau et al., 2001). También son capaces de transdiferenciarse en células de tejidos no hematopoyéticos como hígado, páncreas, corazón, cerebro, y riñón. Las CMH son pluripotentes, con alto potencial de proliferación y autorrenovables (Szilvassy, 2003). Se ha demostrado la presencia de hepatocitos, cardiomiocitos y neuronas con cromosoma Y en mujeres que recibieron trasplantes de médula ósea de donadores masculinos (Rosenthal, 2003; Sylvester y Longaker, 2004; Blau et al 2001; Szilvassy, 2002; Weimann et al., 2003; Quaini et al., 2002).

La CMH tiene un ciclo de renovación de alrededor de 30 días, son inducidas a hematopoyésis y experimentan una serie de divisiones para la maduración donde coexisten progenitores con células que aumentan su diferenciación y restringen su proliferación hasta alcanzar los linajes mieloide o linfoide. Las células maduras tienen una vida que varía en el ser humano de 1 día en neutrófilos a 120 días en los eritrocitos. Mantener números adecuados de células maduras requiere de la activación secuencial de clones de CM sucesivas. Este proceso está regulado por glicoproteínas que actúan como factores de crecimiento o como inhibidores de proliferación y por citoquinas (Szilvassy, 2003; Baron et al., 2003). En la médula ósea, menos del 0,1% de las células hematopoyéticas son CM pluripotenciales capaces de proliferación a tiempo prolongado y autorrenovación. El procedimiento que mejor las define es la capacidad de mantener la regeneración completa del sistema linfohematopoyético por más de seis meses

después de TMO, que identifica un grupo de células de cantidad variable con potencial de repoblación por largo tiempo (LTR) (Szilvassy, 2003; Baron et al., 2003; Wognum et al., 2003).

En adultos la mayoría de las CMH se encuentran en la MO, donde se asocian con células madre mesenquimatosas (CMM) y constituyen el microambiente hematopoyético, en donde producen los factores de estimulación e inhibición del crecimiento que regulan su desarrollo. El tráfico de algunas de las células LTR a través de la circulación explica su amplia distribución en todo el organismo en tejidos que no son hematopoyéticos como el músculo esquelético, riñones, corazón, pulmón, hígado, cerebro e intestino delgado. En el ser humano las CMH pueden ser movilizadas a sangre periférica con el factor de crecimiento de colonias de granulocitos (G-CSF), permitiendo la selección de este grupo de células para trasplante utilizando protocolos de trasplante con células de sangre periférica.

Durante la vida fetal las CMH obtenidas del hígado tienen tasas de proliferación mayores que las CMH de la MO. Sin embargo la CMH-f tienen defectos para la nidación en la MO por formas de integrinas de baja afinidad que no permiten una buena adherencia a las células del estroma (Szilvassy, 2003; Baron et al., 2003).

Cordón umbilical: son una fuente de CMH trasplantables, primitivas en su origen ontogénico, disponibles sin riesgo de obtención para el donador y crioconservables a partir del nacimiento (Baron et al., 2003; Cohen y Nagier, 2004; Gluckman et al., 1998; Sirchia y Rebull, 1999; Lewis, 2002). Por la inmadurez del sistema inmune del recién nacido, los linfocitos presentes en la sangre del cordón umbilical (SCU) son más tolerantes de los antígenos leucocitarios humanos (HLA) y permiten su uso en casos en que hay más discrepancias entre donador y receptor, provocando menos enfermedad injerto versus huésped en el receptor cuando se hacen alotrasplantes. Esto permite conseguir un donador con más facilidad, sin embargo cuando se les compara con CMH obtenidas de MO o SP las de CU tienen un tiempo de implantación mayor y las dosis de células disponibles para el trasplante son menores (Gluckman et al., 1998; Sirchia y Rebull, 1999). Sin embargo su capacidad de expansión puede ser utilizada en la actualidad para inducir proliferación in vitro y mejor la dosis de células disponible para el trasplante (Rocha et al., 2004; Gluckman, 2004).

Mesenquimatosas: representan un segundo grupo de células progenitoras que residen en la MO, se les consideraba como las células del estroma o el sustrato celular de soporte para las CMH. Recientemente se ha demostrado su capacidad de convertirse varios linajes de células mesenquimatosas como adipocitos, condrocitos y osteoblastos. Es una célula con una aplicación potencial en la regeneración del tejido conectivo. Se ha identificado su presencia en los componentes del cordón umbilical (Wang et al., 2004).

Adultas progenitoras multipotentes: se han identificado como una población de la MO, con capacidad semejante a las CME. Se han aislado también de músculo y del cerebro. Son capaces de adoptar fenotipos funcionales de ectodermo (neuronas), endodermo (hepatocitos) y linajes mesenquimatosos y hematopoyéticos (Blau et al., 2001).

1.6.7.6.- APLICACIONES CLÍNICAS

1.6.7.6.1.- TRANSPLANTE DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS.

El trasplante de CMH ha sido la aplicación clínica más conocida de las CM. Las diferentes variantes del procedimiento permiten el uso de células del receptor (autólogo) o de un donador (allogénico). El trasplante allogénico puede realizarse con

células obtenidas de un donador familiar idéntico o de uno haploidéntico, en el que se ha depletado el paquete celular de Linfocitos T. También es posible utilizar un donador idéntico no familiar, identificándolo en un registro internacional.

Las células para el trasplante se pueden obtener por aspiración de médula ósea, de sangre periférica después de movilizarlas con factores de crecimiento hematopoyético o bien de cordón umbilical (Arai y Klingemann, 2003). Cada tipo de trasplante se adapta a la patología que se desea tratar y a la disponibilidad del donador. Los resultados de los diferentes tipos de procedimientos permiten compararlos utilizando parámetros como sobrevida, morbilidad, enfermedad injerto vs huésped, reconstitución del número de neutrófilos y el tiempo transcurrido hasta la implantación (Daley et al., 2003; Stocum, 2005; Gerritsen et al., 1994; Porras, 1993; Weissman, 2000). El trasplante usando CMH ha mejorado las posibilidades de tratamiento de muchos pacientes, al dar la opción de utilizar un injerto con menos restricciones de compatibilidad con el receptor. Sin embargo el periodo de tiempo de implantación es mayor y la recuperación hematológica más tardía.

Las células hematopoyéticas progenitoras de cordón umbilical, son una alternativa para la médula ósea en trasplantes. El primer trasplante con sangre de cordón umbilical se realizó en 1988 (Rocha et al., 2004). El resultado del trasplante usando CU o MO son similares y no hay diferencias de toxicidad. A favor de las CMCU está la mayor facilidad de identificar un donador, la disponibilidad inmediata de las células criopreservadas, la ausencia de riesgos para el donador y una mejor tolerancia inmunológica que permite menos restricciones por incompatibilidad HLA (Rocha et al., 2004; Daley et al., 2003; Stocum, 2005; Chao et al., 2004).

Sin embargo al comparar el uso de CMH-cu con CMH-mo se evidencia que la recuperación del neutrófilos y plaquetas es más tardía, hay mayor riesgo de fallas de implantación y mayor mortalidad asociada con el trasplante en los primeros 100 días (Stocum, 2005; Benito et al., 2004).

La principal restricción al uso de CMCU es las limitaciones en la dosis de CM disponibles para trasplante, en especial en adultos, debido a que este es un factor asociado con implantación y sobrevida. Sin embargo la investigación en los métodos de expansión ex vivo de las CMCU puede resolver el problema de dosis celular (Gluckman, 2004; Chao et al., 2004; Benito et al., 2004; Barker y Wagner, 2003).

En una comunidad se pueden dar dos tipos de opciones para obtener CMCU: una en la cual, en forma privada, se crioconserva células al nacimiento para el uso exclusivo del donador o de algún miembro de su familia, y otra opción en la que las células se conservan en forma anónima y se utilizan como donación para el receptor que las requiera en el manejo de una enfermedad congénita, hematológica, inmunológica o maligna (Weissman, 2000; Burgio et al., 2003). Los bancos de CMH-cu han demostrado en New York y Londres, que son una opción de trasplante con resultados excelentes (Davey et al., 2004; Gluckman, 2000).

1.6.7.6.2.- RECONSTITUCIÓN DE TEJIDOS.

Una de las aplicaciones clínicas en desarrollo activo de la ingeniería de la CM, es la posibilidad de utilizar su plasticidad para reconstituir tejidos dañados o con procesos degenerativos por diversas enfermedades. Células de la médula ósea pueden anidar y diferenciarse en miocitos (Ferrari et al., 1998). En el modelo de ratón de la distrofia muscular de Duchenne, las células diferenciadas producen factores de

transcripción, miogenina y distrofina, demostrando que la CMH-mo son capaces de migrar, anidar, diferenciarse hacia el linaje miogénico y fusionarse con las miofibrillas en respuesta a un daño químico o genético, indicando la posibilidad de reparación del tejido dañado (Ferrari y Mavilio, 2002). En el sistema nervioso central, CMH-mo, anidan y expresan proteínas neuronales (Brazelton et al., 2000).

Procesos semejantes de diferenciación se han reportado, hacia células hepáticas (Petersen et al., 1999; Theise et al., 2000), neuronas (Blau, 2001), vasos sanguíneos, músculo esquelético, riñón, pulmón, piel y hueso (Blau, 2001; Horwitz, 2003; Arai et al., 2003). Las células CME se diferencian en estructuras que secretan insulina y semejan islotes del páncreas (Lumelsky, 2001). El comportamiento de las CMH-mo en el sistema nervioso central y en el corazón ha permitido plantear la posibilidad de transplantar estas células en estos dos tejidos, para contribuir a la reparación de las lesiones, con la generación de tejido nuevo (Stocum, 2005).

El potencial de diferenciarse en cardiomiocitos se ha demostrado en CME, CMMO, CMM y en una población de células cardíacas progenitoras residentes en el tejido cardíaco (Smits et al., 2005; Yoon et al., 2005; Kumar et al., 2005; Jain et al., 2005; Pandur, 2005).

La investigación en el campo del trasplante de mioblastos, ha demostrado que esta tecnología tiene el potencial de ser un componente importante en el manejo de las lesiones isquémicas y en el tratamiento de la falla cardíaca con mejoría de la contractilidad cardíaca (Wollert y Drexler, 2005; Menasche, 2005; Kh Haider y Ashraf, 2005).

1.6.8.- AVANCES EN LA TERAPIA CELULAR EN EL MUNDO

Para nuestra especie humana ha sido siempre un motivo de intriga, misterio y porqué no regocijo el singular parecido entre padres e hijos, entre abuelos y nietos o entre hermanos. “Cada cosa quiere permanecer en sus ser” señalaba Spinoza en el siglo XVII, la planta engendra nuevas plantas, el árbol engendrando nuevos árboles, el pájaro engendrando nuevos pájaros y así sucesivamente, de tal manera que pareciera que en la intimidad de lo viviente se reforzara un anhelo de perpetuidad, en un proceso que pretende “legar” sus estrategias de supervivencia, de identidad y de adaptación. Como seres vivos, somos el resultado del funcionamiento de millones de máquinas microscópicas (las proteínas) que nos permiten movernos, respirar, obtener energía e intercambiar material con nuestro entorno, etc, y lo más paradójico es conocer que toda la información necesaria para construir todo cuanto somos, se guarde en una base de datos independiente (Fuchs, 2000). Los genes, que discurren aislada y establemente a lo largo de las generaciones, transmitida de padres a hijos hasta cierto punto de forma ajena a los avatares de la existencia individual.

Todo el mundo, en todas partes, ha escuchado hablar ya de las células madre. La derivación y el uso de células madre embrionarias ocasionan importantes dilemas éticos para algunos científicos y pacientes, mientras que muchos otros argumentan que es necesario seguir cualquier enfoque natural para curar la fibrosis quística. No se trata de abordar el debate ético sobre las células madre embrionarias sino explicar porqué un enfoque a la terapia con células madre (“transferencia nuclear de células somáticas” o clonación terapéutica), es de particular importancia para la fibrosis quística y otras enfermedades (Daniel et al., 2006).

Cada persona comenzó como una única célula madre, compuesta de un espermatozoide y un óvulo. Luego de la fertilización esa célula madre da origen a cada tejido del cuerpo; en el feto en desarrollo y en el bebé recién nacido hay muchas células madre en prácticamente cada tejido del cuerpo, incluyendo los pulmones. Sin embargo, las células madre que mejor se saben usar en medicina son, en estos momentos, las de la médula ósea que elaboran los glóbulos blancos y los glóbulos rojos de la sangre. En el trasplante de médula ósea (para un niño con leucemia o con anemia de células falciformes), las células madre de un pariente o de un donante compatible, pueden reemplazar las células madre originales del niño y darle un nuevo conjunto de glóbulos. También hay en desarrollo terapias para emplear células madre de pacientes para tratar quemaduras (como alternativa a los injertos de piel) y usar células madre para tratar enfermedades oculares (porque el ojo no rechaza las células “extrañas” de manera tan activa como lo hacen la médula ósea o el pulmón), (Daniel et al., 2006).

Actualmente, las enfermedades degenerativas constituyen uno de los principales problemas sanitarios de los países desarrollados. Estas enfermedades se deben, por lo general, a defectos génicos, lesiones traumáticas, estilo de vida o al progresivo envejecimiento de la población.

Una característica común en este tipo de enfermedades es la alteración de tejidos y/o la desaparición de ciertos tipos celulares, provocando una disfunción en distintos órganos. Los fármacos utilizados en el tratamiento de estas enfermedades frecuentemente alivian únicamente los síntomas, en vez de reparar el daño tisular. Precisamente, el objetivo de la terapia celular es restaurar esos componentes dañados o ausentes para así intentar recuperar la función del órgano en este tipo de enfermedades (Avots, et al., 2002).

Las aproximaciones de la terapia celular son muy variadas: el uso de células autólogas (del propio paciente), alogénicas (de un donante), xenotransplantadas (procedentes de animales generalmente), el uso de células madre adultas o embrionarias, células humanas modificadas genéticamente para producir determinadas sustancias o células transdiferenciadas que ejercen funciones celulares que antes le eran ajenas (por ejemplo, la producción de insulina por hepatocitos transdiferenciados en células beta), entre otras (Daley, 2002).

Todas estas técnicas presentan frente a otras la ventaja de su versatilidad, por lo que las patologías a las que pueden dirigirse son muy variadas. Han sido aplicadas con mayor o menor éxito a patologías tan diversas como disfunciones hormonales (diabetes o déficit en la hormona del crecimiento), lesiones cardiovasculares (isquemia, infarto de miocardio), enfermedades neurodegenerativas (Parkinson, Alzheimer, Corea de Huntington), lesiones osteoarticulares o simplemente en lesiones en las que haya que regenerar un tejido (como una fístula) (Wernig et al., 2007).

Parece claro el interés que tiene en el tratamiento de patologías hasta ahora incurables y como la investigación en este área permitirá identificar los aspectos claves para hacer de la terapia celular una técnica segura y eficaz que constituya un avance sin precedentes en el campo de la medicina.

Consciente de la importancia que la terapia celular tiene para la sociedad y de las posibles aplicaciones en el ámbito clínico de los resultados de las investigaciones, la Comunidad mundial entera ha puesto en marcha varias iniciativas encaminadas a promocionar la investigación de excelencia y la transferencia de conocimiento en este ámbito (Okita et al., 2007).

En muchos países del mundo (Los Estados Unidos del America del Norte, Japón, Canadá, España, Inglaterra, Alemania, Australia, Corea del Sur, etc., se ha promovido y financiado programas de investigación dedicados al estudio de células

madre, centrando, por ejemplo, sus investigaciones en determinar las variables que permitirán aplicar con total seguridad el uso de la células madre para el tratamiento de diversas enfermedades; o determinando las propiedades biológicas y posibles aplicaciones clínicas de las células madre mesenquimatosas (Gretchen, 2005). Además, realizan estudios relacionados con la biología de precursores hematopoyéticos, terapia génica y estudios sobre la estabilidad, biología y aplicación clínica de células madre.

1.6.9.- INDICACIONES TERAPEUTICAS DE LA TERAPIA CELULAR

1.6.9.1.- GENERALIDADES

El objetivo de la Terapia Celular es restaurar la función de órganos y tejidos dañados como consecuencia de lesiones traumáticas, enfermedades degenerativas crónicas, cáncer etc. La práctica totalidad de los medicamentos disponibles hoy para el tratamiento de este tipo de enfermedades consisten en fármacos tradicionales que ayudan a aliviar los síntomas de la enfermedad pero que no constituyen una reparación definitiva del tejido dañado (Bernad et al., 2007; Dominguez et al., 2007). Por otra parte, hoy se vislumbra la posibilidad de encontrar una forma de restituir los procesos biológicos que han resultado dañados en el curso de la enfermedad, mediante la aportación de precursores celulares sanos, o por la aplicación del factor o factores producidos normalmente por dichas células.

La terapia celular no solamente puede ser utilizada para la reparación de tejidos, sino también como un sistema innovador para el suministro de terapias, vehiculadas por las células implantadas en el paciente. Es el ejemplo de la terapia génica *ex vivo*, en la que células obtenidas de un paciente se modifican genéticamente para incorporar un gen terapéutico y ser reintroducidas en el paciente (Kimmelman, 2005). Esta técnica se ha usado de forma experimental con éxito en el tratamiento de inmunodeficiencia severa en niños.

Fundamentalmente, la Terapia Celular es el primer método biológico científicamente afianzado, que recurriendo a un material de sustitución joven, permite reparar o regenerar células deficientes del organismo humano, es decir trata de la utilización de células embrionarias o neonatales para permitirle al cuerpo que se restaure a sí mismo. Los especialistas indican que el término más relativo para esto es la “Revitalización Celular”. Este método puramente natural biológico tiende más bien a una revitalización de las células y de los órganos cansado y envejecido (Hernández, 2006).

Hay varias formas de utilizar este material celular; Células Frescas que tienen que ser administradas inmediatamente o en un plazo de un máximo de tres horas luego de que se obtienen; Células Congeladas en temperaturas extremadamente bajas que tienen que ser inyectadas y finalmente Células Liofilizadas, que se han sometido a un proceso de sublimación, mediante el cual se le extrae el agua sin alterar su cualidades y composición, este ha resultado ser un excelente y conveniente método de cumplir los mas estrictos controles sanitarios y preservar las sustancias biológicas (Hernández, 2006)

1.6.9.2.- LOS CASOS INDICADOS DE LA TERAPIA CELULAR

Las patologías a las que puede dirigirse la terapia celular son también muy variadas: disfunciones hormonales como la diabetes o el déficit de hormona del crecimiento, enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson, el Alzheimer o el Huntington, lesiones cardiocirculatorias como el infarto de miocardio o la isquemia vascular periférica, lesiones muculoesqueléticas, articulares u óseas, cáncer etc. Esta aparente variedad no oculta el hecho de que, aún con las peculiaridades de cada caso, los principios subyacentes de la terapia celular son comunes, por lo que es muy ventajoso abordar su investigación, desarrollo e implementación clínica de forma conjunta (Urbano-Ispizua et al., 2001).

La Terapia Celular, ha demostrado su eficacia en los problemas (Torres, 2000):

- 1) Revitalización: Uno de los mejores efectos de la terapia celular se ha logrado en el retraso del envejecimiento de los tejidos, y una mejor salud de nuestro cuerpo. Las células en este caso se aplican en grupos de tejido las cuales al ser metabolizadas producen grandes cantidades de colágeno logrando desaparecer las arrugas y evitar el surgimiento prematuro de éstas. Las células que actúan a nivel hormonal logran mejorar nuestra respuesta sexual tanto en los hombres como en mujeres. Las células que actúan a nivel cerebral logran mejorar nuestra memoria, actividad mental y lograr así que las curvas normales de vida que decaen a los 50 años lo hagan a los 70 años, mejorando nuestra potencia física e intelectual.
- 2) Insuficiencia circulatoria: adormecimiento en manos, pies, piernas, disminución de la memoria, insomnio, mareos, disminución de la visión.
- 3) Encefalopatía crónica de los niños: debido a defectos congénitos o adquiridos.
- 4) Síndrome de Down: Mongolismo.
- 5) Afecciones nerviosas: como, enfermedad de Parkinson, y síndromes cerebrales degenerativos.
- 6) Infecciones recurrentes.
- 7) Cáncer.

- 8) Enfermedades degenerativas en huesos y articulaciones.
- 9) Osteoporosis.
- 10) Dolores asociados a discos intervertebrales: ciática, dolor de hombro, brazo y mano.
- 11) Degeneración miocárdica crónica: debida cardiopatía arterioesclerótica o hipertensión.
- 12) Trastornos circulatorios debido a hipotensión.
- 13) Insuficiencia circulatoria de los ojos: del fondo de ojo, del nervio óptico y del oído interno. (Otosclerosis)
- 14) Enfermedad pulmonar obstructiva crónica: EPOC o enfisema.
- 15) Infecciones crónicas de la tráquea y de los bronquios.
- 16) Falta de resistencia a las infecciones de la nariz: de senos paranasales y de garganta.
- 17) Degeneración crónica del tracto digestivo: con problemas gastrointestinales.
- 18) Insuficiencia en la producción de enzima pancreática: dispepsia, mala absorción, spru.
- 19) Diabetes.
- 20) Enfermedades crónicas del hígado
- 21) Enfermedades crónicas del colon: colitis.
- 22) Enfermedades crónicas de la piel: psoriasis, eczemas.
- 23) En la curación de heridas y fracturas: como consecuencia de accidentes o cirugías.
- 24) Infertilidad de la mujer.
- 25) Menopausia: evita tomar hormonas.
- 26) Impotencia o esterilidad masculina.
- 27) Trastornos del desarrollo en lactantes, niños y adolescentes.
- 28). Obesidad: por cualquier trastorno
- 29) Artritis: reumatoidea o deformante.
- 30) Úlceras de las piernas.
- 31) Nefropatías.
- 32) Estado premalignos.

La terapia celular se perfila como una de las técnicas más prometedoras del futuro arsenal médico para la reparación de tejidos destruidos o dañados. Las aproximaciones terapéuticas son varias, incluyendo el uso progenitores autólogos o heterólogos, de células madre adultas o embrionarias, de factores tróficos o bombas celulares que los produzcan para movilizar las células madre residentes o favorecer su proliferación y diferenciación, de manipulaciones genéticas para inducir efectos específicos.

1.6.9.3. EL USO DE CELULAS MAMIFERAS EN LA TERAPIA CELULAR

Esta científicamente comprobado que los seres humanos pertenecemos a la familia de los mamíferos, partiendo de este conocimiento, y de que el principio de toda vida son las células, la ciencia ha demostrado que el metabolismo de estas es universal, su ADN, sus proteínas, su composición en general, a su vez las células de todos los seres vivos tienen la misma función que es la de reparar tejidos y así regenerar los órganos deteriorados. El proceso de toda Terapia Celular inicia con la selección de las células de órganos específicos a partir de que un embrión mamífero específico es criado especialmente para este propósito. La Terapia Celular utiliza los órganos de embriones en la fase final de desarrollo dentro del útero. Las células embrionarias son más compatibles con el receptor por ser las de propiedades alergénicas más bajas. La criatura no-nacida en el útero (embrión), todavía no ha desarrollado ninguna actividad inmunológica por sí mismo, es de hecho, un "implante" tolerado por la madre. Si no fuese así, el organismo rechazaría a la nueva vida en el útero como un cuerpo extraño (Tseng, 1989).

Debido a que las células embrionarias no contienen antígenos, éstas no son reconocidas como extrañas por el cuerpo humano y son perfectamente asimiladas por el organismo humano. De acuerdo a la teoría del doctor suizo Paul Niehans en 1931, descubrió que éstas circulan desde el lugar de la inyección hasta donde son reconocidas y congregadas por los mismos órganos humanos de los cuales fueron tomados (las células del hígado van hacia el hígado, las células sexuales van a los órganos sexuales, las células del corazón van hacia el corazón, etc.). Estas células jóvenes tienen una función específica, imprimen su vigor en las células viejas, agotadas y degeneradas, estimulando su función con una eficiencia renovada. Luego como consecuencia, los órganos a su vez retienen el vigor y vitalidad (Tseng, 1989).

Muchos años de experiencia han mostrado que la oveja por ejemplo, es el mejor mamífero específico donante, esto debido a que es una especie fuerte y llena de vigor con el mejor sistema inmunológico y resistencia natural contra enfermedades. Las proteínas de las células de la oveja son genéticamente compatibles con el cuerpo humano y no desencadenan reacciones inmunes. En la Terapia Celular, estas células jóvenes con su fuerza vigorosa de vida energizante todavía activa, son inyectadas en el ser humano para dar comienzo al proceso regenerativo (Bernad et al., 2007).

1.6.9.4.- METODO DE APLICACIÓN DE TERAPIA CELULAR

La Terapia Celular, se aplica a través de una Inyección en forma sub-cutánea profunda en la región del abdomen, vía intravenosa (solución salina), intramuscular (glúteo), región pubica, etc. Cuando estas células llegan al organismo humano, son inmediatamente atacadas por los glóbulos blancos que se hallan en el torrente sanguíneo y reducidas a filamentos. El paciente no requiere de hospitalización, aunque bien conviene guardar reposo por implante de 2 o 3 días y llevar una dieta durante 30 días que le indicará el doctor. Todo esto favorece la absorción plena del material biológico. Se debe seguir las siguientes indicaciones (Nishimori, 2006):

24 horas antes del implante no comer carne de res, de cerdo, embutidos, ni lácteos, ni sus derivados.

Después del implante debe seguir la misma dieta durante un mes.

Están permitidos: pollo, pescado, verduras, vegetales, preferiblemente hervidas y sin grasas, dependiendo de las patologías.

1.6.9.5.- ESTUDIOS PREVIOS AL TRATAMIENTO (EN ALGUNOS CASOS)

Antes de la aplicación de la Terapia Celular, se hace una historia clínica del paciente y de acuerdo a las deficiencias funcionales que se encuentren, serán elegidos los tejidos celulares a implantar siguiendo la siguiente secuencia (Nishimori, 2006):

- 1) Estudio de la posibilidad de la aplicación de la Terapia Celular (TC)(Consulta).
- 2) Valoración Integral de cada paciente "check up" de estudios de laboratorio:
Biometría Hemática; Química Sanguínea 24; Perfil Hormonal; Perfil Hepático; Páncreas y Colon.
- 3) Valoración de historia clínica: Antecedentes de familia; Antecedentes de estado de salud y enfermedades pasadas; Estado actual de salud y enfermedades presentes.
- 4) Valoración Integral.
- 5) Implante de la Terapia Celular.

El estado de salud de cada ser humano es muy particular. De acuerdo al diagnóstico que el médico realiza, se determina el tratamiento a seguir. Es por ello que cada diagnóstico es cuidadosamente estudiado para así poder adecuar el tratamiento óptimo que beneficie al paciente. Por lo tanto la frecuencia con que cada tratamiento se debe aplicar será programada por el médico especialista en la materia de acuerdo con las necesidades de cada caso particular. Cuando está bien indicada, la Terapia Celular no tiene ningún riesgo. El único riesgo es el no usarla en presencia de enfermedades crónicas degenerativas, agudas o terminales para que así el paciente pueda mejorar su salud y calidad de vida. Estudios de rastreo, monitoreo y documentación en pacientes a los que les ha implantado la Terapia Celular Regenerativa, han demostrado que no existe complicación o repercusión negativa alguna en la salud de los mismos, sino todo lo contrario, pues muestran una mejoría extraordinaria (Amariglio et al., 2009).

En breve, el campo de acción de la Terapia Celular es muy amplio, desde pacientes con algún diagnóstico específico, hasta personas sanas que no sufren una enfermedad crónica-degenerativa y que simplemente desean conservarse en buenas condiciones, útiles, productivos, que buscan recuperar fuerza física y mental, esta terapia es excelente. Estos tiempos que nos toca vivir son estresantes, demasiadas prisas y carreras, siempre el estrés es un factor tóxico para el organismo ya que deteriora y hace envejecer prematuramente. En estos casos la terapia celular es un tratamiento anti-estrés y anti-envejecimiento extraordinario. Por otro lado en pacientes que padecen un cuadro crónico-degenerativo la terapia celular viene a regenerar a nivel molecular los tejidos y órganos deteriorados por la edad, las enfermedades, el estrés y los malos hábitos. Uno de los órganos que mejor responde a la terapia celular y se regenera más fácilmente es el hígado, aun en casos de cirrosis grave o muy avanzada. En presencia de artritis, nos ofrece resultados muy satisfactorios, así como en diabetes, tumores, presión arterial, infartos, alergias, secuelas de accidente vascular cerebral, esclerosis múltiple, osteoporosis, problemas de la columna vertebral y rodillas, piel, lupus eritematoso sistémico, etc. Igualmente, en todos aquellos pacientes en donde solo sea necesario potenciar el sistema inmunológico, ya sea por una infección viral crónica, como en la Hepatitis "C", así como en tratamientos de quimioterapia, este tratamiento es excelente. La Terapia Celular, viene a ser un factor de ayuda importantísimo para la salud, ya que lo único que puede ofrecer a estos pacientes y personas en general, es

mejorar su calidad de vida a través de la revitalización de las células, retrasando así el reloj biológico del organismo. Este tipo de tratamiento, tiene la intención de crear en el ser humano la cultura de la prevención, convirtiéndose así la Terapia Celular Regenerativa en la medicina moderna (Amariglio et al., 2009).

1.7.- CULTIVO CELULAR

1.7.1.- INTRODUCCIÓN HISTÓRICA.

El cultivo celular es el proceso mediante el que células, ya sean células procariotas, eucariotas o vegetales, pueden cultivarse en condiciones controladas. En la práctica el término "cultivo celular" se usa normalmente en referencia al cultivo de células aisladas de eucariotas pluricelulares, especialmente células animales. Es una técnica de crecimiento de células *in vitro*, que permite reproducir las condiciones existentes *in vivo* (Barnes y Sato, 1980). El desarrollo histórico y metodológico del cultivo celular está íntimamente ligado a los del cultivo de tejidos y el cultivo de órganos. El cultivo celular o cultivo de tejidos, como también se le llama, tiene su origen en el siglo XIX, como un método para el estudio del comportamiento de las células animales libres de las variaciones sistémicas ocurridas dentro del organismo durante su normal homeostasis y bajo el estrés de un experimento (Douglas et al., 1980; Barnes y Sato, 1980). Estas técnicas iniciaron con el cultivo de fragmentos no disgregados de tejidos, los cuales restringían la mitosis de las células cultivadas y por tanto su crecimiento. Después se realizaron cultivos con fragmentos disgregados de tejidos, los cuales aumentaban el crecimiento celular en cultivo ya que se utilizaban células dispersas; esto fue un gran avance y provocó una explosiva expansión en esta área desde los años 50s (Morgan, 1950).

Como se ha dicho anteriormente, el cultivo de tejidos se desarrolló a partir de los últimos años del siglo XIX como una continuación de las técnicas de la embriología. Wilhem Roux (1885) mantuvo células de embrión de pollo en solución salina durante unos días. El zoólogo americano Harrison (1900) es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales, en 1907 (Birch y Pirch, 1971).

Harrison fue el primer autor que empleó técnicas *in vitro* para el estudio de fenómenos *in vivo*, realizando cultivos de médula espinal embrionaria de anfibios. Pudo observar el crecimiento de los axones de los neuroblastos, y estableció que el axón se formaba por expansión a partir del cuerpo neuronal y no por fusión de una cadena de células. El cultivo se realizaba en una gota de linfa del anfibio que colgaba de un cubreobjetos sobre una cámara sellada (Birch y Pirch, 1971).

La primera limitación para el establecimiento de cultivos era lograr un medio nutritivo adecuado. Burrows (1910) empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo. Este medio se reveló mucho mejor que los anteriormente probados, lo que le permitió observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel (Eisinger et al., 1979).

Burrows y Carrel (1910) realizaron los primeros intentos de establecer cultivos de células de mamífero, y consiguieron mantener explantes obtenidos a partir de perros, gatos y conejos de indias, así como en el crecimiento de tumores sólidos. Demostraron

que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivo (Eisinger et al., 1979). Los medios empleados fueron plasma suplementado con extractos de embrión.

Rous y Jones (1916) emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para disociar las células de embriones de pollo, estableciendo el primer cultivo celular. Uno de los mayores problemas que describen para el establecimiento de los cultivos celulares es la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación en condiciones de asepsia que aún hoy día se utilizan (Pelman, 1979).

Carrel (1913) demostró la posibilidad de mantener en cultivo células extraídas de un animal, embrión de pollo, durante un periodo de tiempo superior al de la vida de éste. Mantuvo en cultivo células de pollo durante 34 años (Pelman, 1979; Eisinger et al., 1979). Gran parte del éxito en el mantenimiento de los cultivos se debió al desarrollo del denominado frasco de Carrel, soluciones corporales complejas (sueros) pueden ser satisfechas por tan poco como el 1% de suero de caballo dializado en un medio definido de pequeñas moléculas de aminoácidos, azúcares, etc., (Freshney, 2005).

Hayflick y Moorhead (1961) usaron por primera vez antibióticos para prevenir la contaminación de los cultivos de fibroblastos. Pudieron mantener estos cultivos durante unos 12 pases, pero no consiguieron establecer líneas estables (Doyle et al., 1996).

Ham (1965) introdujo el primer medio definido libre de suero capaz de mantener algunas células de mamífero en cultivo indefinidamente; Augusti-Tocco y Sato (1969) establecieron la primera línea celular estable de neuroblastoma aislando clones que establecían procesos nerviosos y que eran eléctricamente excitables (Mather y Barne, 1998). Se empiezan a establecer las primeras líneas celulares diferenciadas.

Kohler y Milstein (1975) trabajaron la primera línea celular productora de anticuerpos monoclonales (Pera et al., 2000). El establecimiento de la tecnología de obtención de anticuerpos monoclonales les valió el Premio Nobel. Y, Sato et al., (1976) publicaron sus trabajos en los que demuestran que las diferentes líneas celulares requieren mezclas distintas de hormonas y factores de crecimiento para crecer en medios libres de suero. (Barnes y Sato, 1980). Entre los años 1920 y 1940 se desarrollaron diferentes estrategias de obtención de cultivos y de mantenimiento de las condiciones estériles, pero sin grandes avances. A partir de los años 40, con el aislamiento de los primeros antibióticos, se desarrollaron numerosas aplicaciones de entre las que se puede destacar (Doyle et al., 1996).

Earle et al., (1948) aislaron células de la línea celular L y mostraron que eran capaces de formar clones en el cultivo de tejidos. Demostraron que para que una célula llegue a dividirse necesita ser alimentada con los nutrientes correctos (Doyle et al., 1996).

Grey et al., (1952) establecieron la primera línea celular continua, las actualmente bien conocidas células HeLa. El medio empleado era extremadamente complejo y poco definido: plasma de pollo, extracto de embrión bovino y suero de cordón umbilical humano (Doyle et al., 1996).

Rita Levi-montalcini et al., (1954) desarrollaron que el factor de crecimiento nervioso estimula el crecimiento de los axones en tejidos en cultivo (Celis, 1998). Este trabajo supuso el Premio Nobel para Levi-Montalcini en 1986.

Eagle (1955) realizó la primera investigación sistemática de los requerimientos nutritivos de las células en cultivo (Eagle, 1959).

En los últimos años la aplicación de la tecnología del cultivo celular ha permitido grandes avances en la comprensión de los mecanismos implicados en los procesos intracelulares e intercelulares con el establecimiento de cocultivos (Evans y Briant, 1965).

A pesar de que el primer animal del que se establecieron cultivos celulares era un anfibio, poiquilotermo, rápidamente el interés se centró en el cultivo de células de animales homeotermos, especialmente humanas, por su gran interés médico (Ham y McKeehan, 1978).

1.7.2.-EVOLUCIÓN DE LOS CULTIVOS CELULARES HACIA LA TERAPIA CELULAR

El cultivo de células tuvo su origen en el siglo XIX. Rechlinhausen en 1866, mantuvo vivas células sanguíneas de anfibio, pero fue la utilización de bloques de agar con plasma coagulado (soporte y alimento) el inicio del cultivo de células *in vitro* (Freshney, 2005). El desarrollo del cultivo de células de vertebrados se inició con las observaciones de Roux (1885) en cultivos de células de embrión de pollo; posteriormente Harrison (1907) cultivó tejido nervioso de rana el cual más adelante fue reemplazada por plasma de pollo (Burrows, 1910); posteriormente, se aplicó esta técnica para el estudio en animales de sangre caliente (Ham, 1965). Una serie de innovaciones como el desarrollo de medios de cultivo (Eagle, 1959), el uso de antibióticos, las técnicas de tripsinización para el pasaje de células (Ham, 1963) y la suplementación del medio con suero fetal bovino, permitieron el desarrollo y aplicabilidad de los cultivos de células de origen vertebrado.

El empleo de técnicas de fusión celular (Leighton, 1951; Ham y McKeehan, 1978) establecieron, las bases de la genética de células somáticas para el análisis de especies animales (incluyendo al hombre); igualmente la técnica de anticuerpos monoclonales (Leighton et al., 1968) ha permitido estudios en inmunología y su aplicación a nivel terapéutico.

En la actualidad, pueden cultivarse en el laboratorio células procedentes de una amplia gama de tejidos y organismos diferentes. En un principio, el objetivo principal era el estudio de las propias células, cómo crecen, qué necesitan para su crecimiento, cómo y cuando dejan de crecer. Este tipo de estudios tiene hoy un gran interés científico, por ejemplo, en relación con investigaciones sobre el ciclo celular, el control del crecimiento de células tumorales y la modulación de la expresión genética (Celis, 1998). Otra área de gran interés se centra en la biología del desarrollo. Los esfuerzos para explicar cómo el gran número de células presentes en organismo maduro derivan de una sola célula a partir de la fertilización han llevado a la búsqueda de modelos experimentales.

El cultivo celular es muy adecuado como modelo para el estudio del desarrollo y la diferenciación, por lo que las líneas celulares que conservan la capacidad de diferenciarse *in vitro* son objeto de un intenso estudio. Por último, hay cierto tipo de investigaciones que no pueden realizarse sin el cultivo de células, por ejemplo, el trabajo con animales transgénicos, conduce a que organismos maduros expresen genes nuevos, se basa totalmente en las técnicas de cultivo celular para la inserción de genes extraños en las células receptoras. Así mismo, la tecnología de la fusión celular y los ensayos de citotoxicidad son técnicas de cultivo celular que, en cierto modo, han sido diseñadas para sustituir a la metodología *in vivo* (Cohen, 1995).

1.7.3.- CONCEPTOS ACTUALES DE CULTIVO CELULAR

Actualmente se entiende por conceptos de cultivo celular al conjunto de técnicas que permiten el mantenimiento de las células 'in vitro', manteniendo al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas (Gillies et al., 1986).

1.7.3.1.- ALGUNOS CONCEPTOS DE CULTIVO CELULAR

Los estudios que emplean cultivos celulares abarcan gran número de disciplinas y aproximaciones al estudio del fenómeno celular (Gillies et al., 1986):

a. Actividad intracelular: Mecanismos implicados en los diferentes procesos intracelulares, como por ejemplos, transcripción de DNA, síntesis de proteínas y metabolismo energético.

b. Flujo intracelular: Movimientos intracelulares de sustancias y señales asociadas a los diferentes procesos fisiológicos, como por ejemplos, ensamblaje y desensamblaje de los diferentes componentes intracelulares, movimientos del RNA: núcleo-citoplasma y movimiento de proteínas.

c. Ecología celular: Estudio de las condiciones ambientales responsables del mantenimiento de la funcionalidad celular, de su diferenciación como por ejemplos, estudio de las necesidades nutricionales, infecciones, estudio de la transformación celular (inducidas por virus o agentes químicos) y cinética de la población celular.

d. Interacciones celulares: Procesos de inducción embrionaria, cooperación metabólica, inhibición por contacto o por adhesión e interacciones célula-célula.

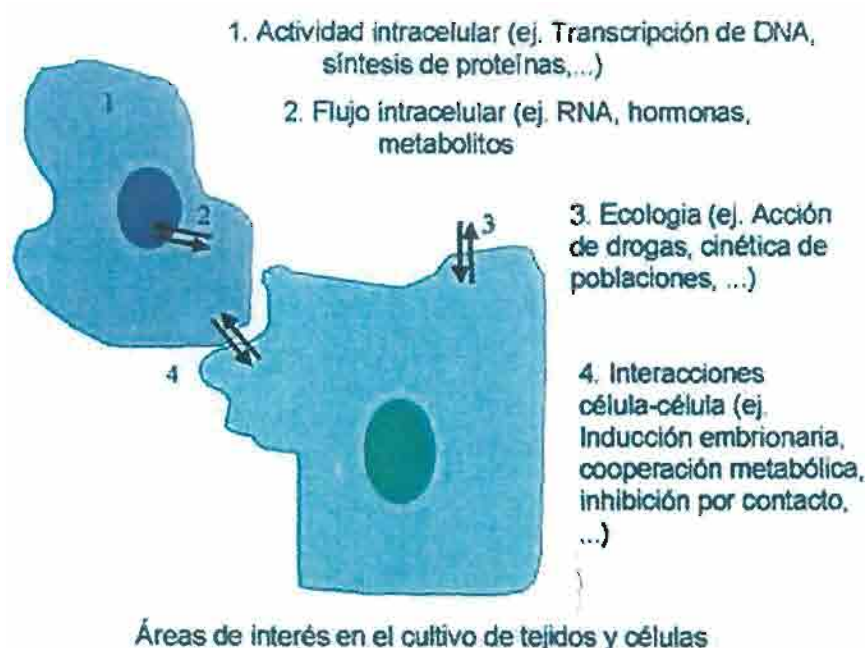


Fig. 24: Puntos de interés en el cultivo de tejidos y células (Freshney, 2005).

1.7.3.2.- ALGUNAS ÁREAS DE INVESTIGACIÓN DEPENDIENTES DE LAS TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR

1. Virología: establecimiento de condiciones de cultivo de virus animales y de plantas y producción de vacunas antivirales.
2. Investigación del Cáncer
3. Inmunología. Gracias especialmente a la introducción de las técnicas de fusión celular en la producción de anticuerpos monoclonales, así como en el análisis de la genética de la célula somática.
4. Ingeniería de proteínas. Por la producción de proteínas en líneas celulares: interferón, insulina, hormona de crecimiento etc.
5. Estudios de interacción y señalización celular, en la diferenciación y en el desarrollo. Comprende el estudio de los receptores y de las vías de translocación de la señal.
6. Aplicaciones diagnósticas. Por ejemplo en medicina y farmacología destacan el análisis cromosómico de células crecidas a partir de muestras de amniocentesis, detección de infecciones virales, ensayos de toxicidad etc.,
7. Aplicaciones médicas: mantenimiento y producción de tejidos para trasplante (Mather y Barnes, 1998).

1.7.4.- BIOLOGÍA DEL CULTIVO CELULAR

La validez de un cultivo celular como modelo de función fisiológica *in vivo* ha sido criticado, ya que se presentan problemas de caracterización por la alteración del desarrollo celular; la proliferación *in vitro* no se presenta de igual manera a la de *in vivo*, debido a la reducción de la relación célula-célula y la interacción matriz-célula por la no presencia de la heterogeneidad y la estructura tridimensional de las células hallada *in vivo*, además porque el medio hormonal y nutricional se ve alterado. Esto crea un ambiente que favorece la difusión, migración y proliferación de células no especializadas, pero no a la expresión de funciones diferenciadas. La provisión de un ambiente apropiado, nutriente, hormonas y sustratos son fundamentales para la expresión de funciones especializadas (Barral et al., 1997).

En un cultivo celular la mayoría de las células crecidas a partir de un tejido sólido disgregado o de un subcultivo tienen la capacidad de adherirse en monocapa, transformarse o anclarse independientemente. Esta adherencia celular es mediada por receptores celulares específicos de superficie en la matriz extracelular y la dispersión celular podría ser precedida por la secreción de proteínas de matriz extracelular y proteoglicanos por parte de la célula. Las células se pueden anclar y difundir en el vidrio donde se cultivan por medio de ligeras cargas negativas y al plástico, como el poliestireno, si tienen una propiedad o tratamiento con descargas eléctricas o con radiación ionizante de alta energía. El cultivo en vidrio o plástico provee condiciones favorables para el crecimiento y anclaje celular (Gonindard et al., 1997; Barral et al., 1997).

El crecimiento de las células en un cultivo celular primario depende de la supervivencia de éstas a las diferentes técnicas de disgregación y a la capacidad de adherirse al sustrato o de sobrevivir en suspensión. Si el cultivo primario es mantenido por pocas horas podría ocurrir un paso de selección futuro (Mather y Barnes, 1998). Las células capaces de proliferar podrían aumentar, otros tipos de células podrían sobrevivir pero no aumentar y otras podrían ser capaces de sobrevivir en condiciones especiales. Además el crecimiento celular va ligado al espacio del cultivo, ya que unas células detienen su crecimiento, mientras que otras lo incrementan (Freshney, 2002).

Se cultivan células de animales y humanos en un caldo de cultivo en el

laboratorio. Las células de humanos y tejidos se pueden obtener de biopsias, *post-mortem*, placentas o de procedimientos quirúrgicos. Se pueden cultivar una amplia variedad de cultivos de células, así como células de cáncer y sangre humanas para investigar cómo los virus provocan infecciones; las células de la placenta humana se pueden utilizar para probar si los medicamentos pueden atravesar la placenta, o células de las articulaciones humanas para estudiar medicamentos contra el reuma (Kaufman y Wu, 1995).

Los cultivos de células y tejidos pueden ser altamente sensibles a las sustancias químicas y permitir a los investigadores estudiar partes del cuerpo específicamente identificadas. Se han utilizado cultivos de células en investigaciones para el cáncer, el Parkinson, SIDA, desarrollo de medicamentos, toxicidad y Alzheimer (Kaufman y Wu, 1995). Son el producto de la colección de células vegetales o animales de diferentes órganos, colocadas en condiciones especiales propicias para su sobrevivencia y multiplicación, manteniendo para esto todas sus funciones metabólicas de una manera semejante a las que tenía en el huésped.

Los cultivos de células animales se han clasificado de acuerdo a su capacidad de anclaje (adherencia), y así han sido aisladas recientemente de un órgano determinado o si provienen de células que han sufrido modificaciones (Fuchs y Segre, 2000).

De acuerdo a su capacidad de adherencia o no a una superficie determinada pueden crecer formando monocapa o en suspensión respectivamente, lo que está muy asociado con el tipo de célula de la cual derivan: por lo general las células provenientes de órganos, crecen en monocapa; igualmente existen células que pueden crecer indistintamente tanto en monocapa como en suspensión, ejemplo son las células HeLa que son células transformadas derivadas de cultivos en monocapa (Gillies et al., 1986).

Cuando el cultivo proviene de células que han sido disgregadas de un tejido original tomado de un órgano de un animal recién sacrificado, recibe el nombre de cultivo primario; cuando éste cultivo primario es sometido a procesos de transformación que le confiere capacidad ilimitada de multiplicación, recibe el nombre de líneas celulares; cuando de un cultivo primario genera otro tipo de células que se pueden separar reciben el nombre de cultivos secundarios y cuando en el cultivo coexisten dos tipos de células de linajes diferentes que se pueden separar recibe el nombre de cocultivo (Freshney, 2005).

1.7.4.1.- TIPOS DE CULTIVO CELULAR

Supone una disgregación celular ya sea por medios enzimáticos o mecánicos. La suspensión celular se puede cultivar como una monocapa adherente o en suspensión en el medio de cultivo (Caputo, 1996). Este tipo de cultivo permite su propagación, aumentando notablemente la masa celular del cultivo a lo largo de las generaciones (Caputo, 1996). Como característica negativa se pierde la heterogeneidad celular de partida (Chen, 1977; Caputo, 1996), la población se hace uniforme y homogénea al predominar en el cultivo aquellos tipos celulares que tienen superior tasa de crecimiento (Freshney, 2005). En la actualidad los cultivos celulares son los más empleados fundamentalmente por la posibilidad de propagación, así como por las ventajas en la cuantificación, caracterización y repetibilidad de las muestras. A fin de compensar la ausencia de interacciones heterotípicas se realizan desde hace unos años cultivos mixtos con importantes éxitos (Freshney, 2005).

1.7.4.1.1.- CULTIVOS EN MONOCAPA

Las células exhiben una variedad de "comportamientos sociales", permitiendo la formación de una monocapa que cubrirá la correspondiente superficie de crecimiento (confluencia), lo que hace que su multiplicación sea inhibida cuando establecen contacto entre sí (quiescencia). Las células provenientes de cultivos primarios son las que mejor crecen en ésta condición, dada su estabilidad genética y su naturaleza diploide normal. Los recipientes para el cultivo de células estacionarias son cajas de Petri, frascos para el cultivo de tejido (Ham, 1978), entre otros, que pueden ser de material de plástico o de vidrio previamente tratado y su desprendimiento para transferirlas a superficies mayores se realizan con agentes proteolíticos como la tripsina (Hay et al., 2000).

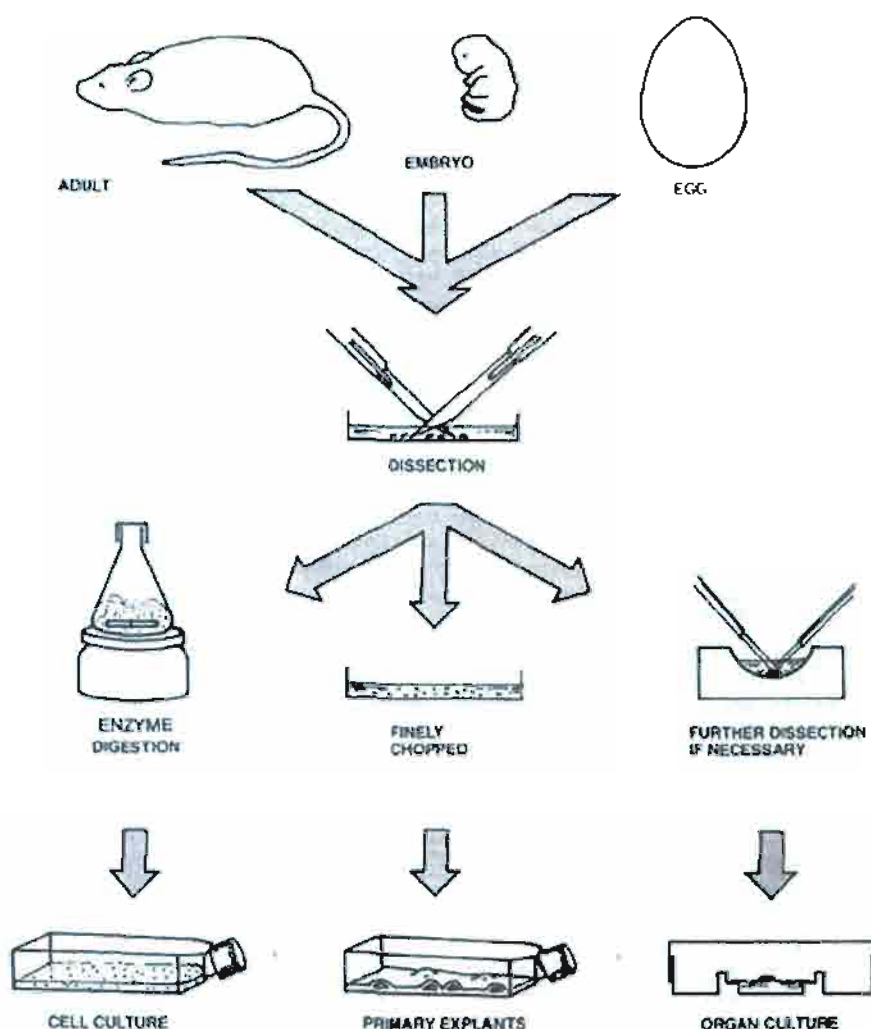


Fig 25 Tipo de cultivo celular: Freshney, 2005

1.7.4.1.2.- CULTIVOS EN SUSPENSION

Las Líneas celulares que provienen de cultivos primarios con requerimiento de anclaje a superficies, tienen la propiedad de crecer de manera estacionaria o en suspensión después de un período de adaptación (Hay et al., 2000). Existe evidencia experimental que los sistemas en suspensión también requieren de matrices que son macromoléculas, que sirven de protectores a la superficie celular; estas macromoléculas se encuentran en el suero, el cual contribuye igualmente con el medio de cultivo, proporcionando un sistema balanceado de nutrientes (Karmiol, 2000; Juliano, 2002), dentro de éstas matrices está el Methocel, esencial para el crecimiento de cultivos en suspensión (Knazek et al., 1972). Aunque el cultivo estacionario es ideal cuando se busca la elaboración de productos extracelulares, el cultivo en suspensión es deseable cuando los productos son intracelulares o cuando se presentan problemas con la capacidad de anclaje de un determinado tipo de célula (Knazek et al., 1972).

El proceso de cultivo continuo ofrece factores económicos decisivos (utilización de mejores equipos, reducida manipulación) cuando se trata de producir cultivos a una mayor escala de operación (Freshney, 2005).

1.7.4.1.3.- CULTIVOS PRIMARIOS

Los cultivos primarios tienen características especiales que los diferencian de las líneas celulares: conservan la morfología de las células del órgano del que fueron aisladas, sus cromosomas tienen un número diploide ($2n$), su crecimiento in vitro es limitado y hay inhibición por contacto (Maas-Szabowski et al., 2002). El estar más cercanas a las células que las originaron, se ve reflejado en una mejor actividad y funcionalidad similar a su ambiente natural, por lo que en aislamientos primarios de cepas virales éstas tienen mayor sensibilidad que una Línea Celular ya establecida. Igualmente para la producción de vacunas los cultivos primarios son recomendables por tener una baja probabilidad de que se transformen en malignos. Dentro de las desventajas está la de una mayor probabilidad de presentar virus adventicios o latentes, lo que implica el desarrollo de la adecuada tecnología para el control de calidad (Freshney, 2005).

1.7.4.1.4.- LINEAS CELULARES

Las Líneas Celulares continuas están formadas por células que se diferencian genética y morfológicamente de las células de las cuales se originaron. Pueden provenir de células que se derivan de tumores o de un proceso de transformación de un cultivo primario mediante transfección con oncogenes o con tratamiento con carcinogénicos, lo que les confiere un nuevo fenotipo (Knazek et al., 1972; Freshney, 2005). Este tipo de cultivo tiene la característica de no tener inhibición por contacto y de crecer de manera indefinida (Maas-Szabowski et al., 2002). El paso de un cultivo primario a línea se denomina transformación (Yang et al., 1981). Una transformación puede inducirse

fisiológicamente (interacción celular, polaridad) a través de hormonas como la hidrocortizona o utilizando inductores no fisiológicos como el DMS.

1.7.4.1.5.- CULTIVOS TRIDIMENSIONALES

Son aquellos que buscan mantener la característica o arquitectura del tejido *in vivo*. Los sistemas tridimensionales permiten estudiar la proliferación y morfología epitelial y su interacción con otras células como son las del tejido conectivo; igualmente con ellos se puede evaluar el efecto de sustancias que pueden influenciar en tales interacciones intercelulares (Ham, 1978). Actualmente se producen Kits dérmicos comerciales con base en cultivos, que permiten evaluar la citotoxicidad de componentes químicos presentes en lociones, preservativos, detergentes, perfumes, shampoos y solventes entre otros. Los intentos de producción de éste tipo de cultivo van desde el uso de telaraña, pasando por el crecimiento de explantes en esponja de celulosa, (Leighton, 1951), así como la utilización de fibras de sílica (Leighton et al., 1968) o de mallas de colágeno hidratado (Barral et al., 1997). El método desarrollado por Bergenholtz (1977) es uno de los que mayor información ha dado en cuanto a visualización de morfología celular. Mediante éste sistema, se colocan trocitos de superficie epitelial sobre una membrana de Millipore, sistema que se deposita sobre una plataforma y ésta en una caja de Petri con medio de cultivo (Karmiol et al., 2000). El cultivo de órganos permite la ampliación de un cultivo de células de tejido no disgregadas a un cultivo tridimensional que muestre en algo o en todo las características histológicas de los tejidos *in vivo*, para esto se utiliza un medio con interfase líquido gaseosa.

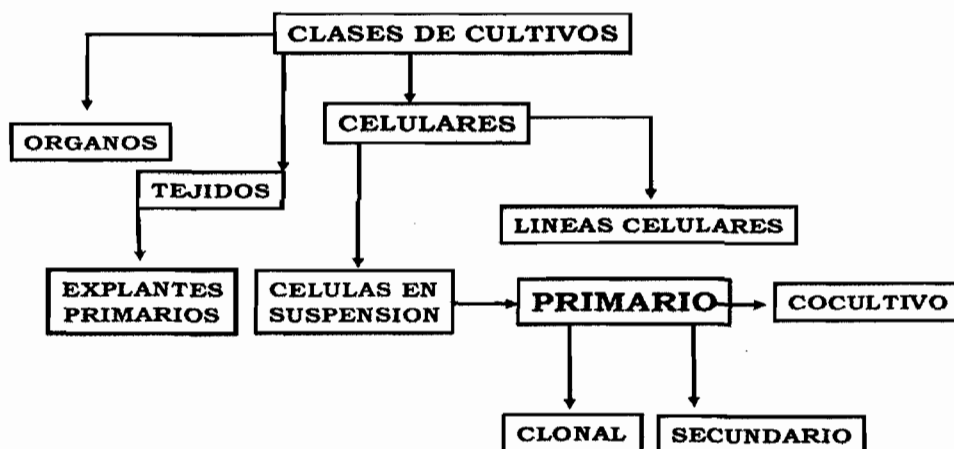


Fig 26 Clases de cultivos: frehsney, 2002

El cultivo de cortes de tejido el cual utiliza fragmentos de tejidos colocados en vasos de vidrio o plástico con un medio con interfase líquida que va a promover la

migración de las células cultivadas hacia un plano sólido provisto de un sustrato específico para cada célula (Freshney, 2002). El cultivo de células dispersas en suspensión se refiere al cultivo de células tomadas del tejido original, de cultivos primarios de células o de una línea o cadena celular por disgregación enzimática, mecánica o química, este cultivo necesita de una monocapa adherente o un sustrato sólido que le provea a las células un medio adecuado para desarrollarse.

Se realiza también el cultivo primario en el cual las células han sido reasociadas para recrear la estructura tridimensional del tejido; esto realizado por perfusión y por el crecimiento de una monocapa, la reagregación en suspensión, o la infiltración de una matriz tridimensional como el colágeno (Freshney, 2002). Derivado del cultivo anterior se encuentra el cultivo secundario en el cual se cultivan diferentes provenientes de una misma, es el caso de los cultivos de astrocitos donde se puede obtener, en un mismo cultivo, crecimiento de los tipos I y II de éstas células (Kruse et al., 1970). En la actualidad se están realizando cultivos que permiten la recombinación de células de diferentes linajes como los queratinocitos de la epidermis en combinación con los fibroblastos de la dermis; a estos cultivos se les denomina cocultivos (Frashney, 2002). Dentro de estos cultivos se encuentran los cultivos de neuronas y astrocitos en conjunto, en los cuales se ha confirmado el ciclo de la glutamina-glutamato por medio de análisis de los isótopos del glutamato y la glutamina, donde la glutamina es producto de los astrocitos y el glutamato y el aspartato producto de las neuronas (Greco y Recht, 2003). Además, se ha estudiado el acetato en estas células, el cual es metabolizado por ambas células, neuronas y astrocitos (Barral et al., 1997).

El cultivo de células transformadas generalmente se obtiene por la inyección de un carcinógeno, después de una serie de cultivos alternados y pasaje por animales (Barral et al., 1997; Frashney, 2002). Estas líneas celulares son capaces de desempeñar sus funciones órgano específicas generalmente durante el período de un año. La forma de estas células depende en gran parte, de las condiciones del cultivo utilizadas. Las células que crecen en cultivos en suspensión son casi siempre redondas con pocas prolongaciones. Sin embargo, cuando las células de origen cerebral crecen sobre superficies planas muestran una diversidad morfológica notable, con prolongaciones celulares y neuronas que se forman con facilidad, mientras que los cuerpos celulares adoptan una forma alargada (Barral et al., 1997).

1.7.4.1.6.- VENTAJAS DEL CULTIVO CELULAR

Las dos principales ventajas cuando se utilizan los cultivos celulares son: el control del medio fisicoquímico, a saber, pH, temperatura, presión osmótica, tensión de oxígeno (O₂) y gas carbónico (CO₂) de las células cultivadas y, las condiciones fisiológicas que deben ser constantes. La mayoría de las líneas celulares requieren para su buen desarrollo de suplementos en el medio en que se cultivan, ejemplo de esto es el suero, el cual provee infinidad de elementos como hormonas y otras sustancias reguladoras (Kaufman y Wu 1995). El control del medio fisicoquímico y de las condiciones fisiológicas permite el cultivo de células específicas. Los cultivos de células permiten someter a las mismas a una baja y definida concentración de reactivos asegurando un acceso directo en ellas, lo que ahorra en un 90% lo requerido para la inyección del reactivo *in vivo*, su excreción y su posterior distribución a los tejidos en estudio. Aunque los estudios *in vivo* resulten más económicos que los *in vitro* son descartados porque el uso de la experimentación en animales resulta cuestionado en

aspectos legales, morales y éticos (Freshney, 2002). Permiten el estudio del transporte y la utilización de metabolitos.

1.7.4.1.7.- DESVENTAJAS DEL CULTIVO CELULAR

Las técnicas de cultivo celular necesitan unas estrictas condiciones de asepsia porque las células animales crecen menos rápido que la mayoría de los contaminantes comunes como las bacterias, los mohos y las levaduras. Además las células precedentes de animales no pueden desarrollarse en medios de cultivo, por lo que es necesario agregar a los medios suplementos como suero, plasma y fluidos intersticiales, entre otros para de una manera u otra proveer a las células cultivadas un medio semejante al *in vivo* (Freshney, 2002). Una mayor limitación en el cultivo de células es el gasto de esfuerzo y materiales para la producción de una pequeña cantidad de células o de tejido.

Los costos de producir células en cultivo son diez veces más que el uso de tejido animal, ya que se invierte bastante en ensayos o procedimientos preparativos que pueden ayudar en la estandarización del proceso reduciendo tiempo de manipulación, volúmenes de muestra, tiempos de centrifugación, etc. (Barral, et al., 1997). En los cultivos celulares se dificulta relacionar las células cultivadas con las células funcionales ubicadas en el tejido del cual son derivadas, esto por que en la mayoría de los casos presentan propiedades muy diferentes; para esto es necesario utilizar marcadores de células los cuales van a ser de gran ayuda en el momento de caracterizarlas en cultivo porque van a garantizar que las células crecidas en cultivo son las mismas que se sembraron y no otras. Además, suelen presentarse problemas de inestabilidad genética cuando se realizan varios pases de cultivos de células no transformadas, lo que va a originar una gran heterogeneidad en el crecimiento de las células y en su diferenciación (Greco y Recht, 2003).

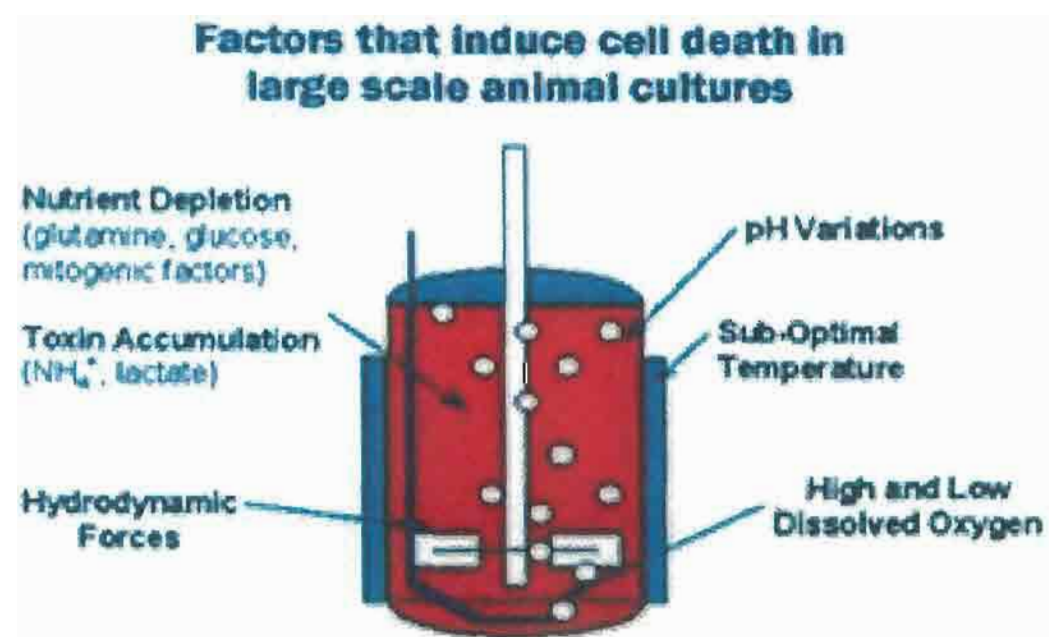


Fig 27: Factores que inducen muerte celular en gran escala de cultivos animales

1.7.4.1.8.- USOS DE LOS CULTIVOS CELULARES

Para el estudio de células específicas, cómo crecen, qué necesitan para su crecimiento, cómo y cuando dejan de crecer, como es su bioquímica. Sirve para las investigaciones sobre el ciclo celular, el control del crecimiento de células tumorales y la modulación de la expresión genética. También sirve para la búsqueda de modelos experimentales, estudios de la biología del desarrollo y la diferenciación celular. Finalmente, sirve para la inserción de genes extraños en las células receptoras (animales transgénicos).

1.7.5.- CONDICIONES FISIOLÓGICAS DEL CULTIVO CELULAR

Hacen referencia a la composición del medio. Ya se indicó que la principal dificultad para el establecimiento de las líneas celulares es el de obtener medios nutritivos adecuados que sean capaces de reemplazar al medio "natural" como extractos embrionarios, hidrolizados de proteína o sueros. Un primer grupo de medios tales como el medio basal de Eagle (MEM) (Eagle, 1959) y el más complejo 199 de Morgan et al., (Morgan et al., 1950) o CMRL 1066 de Parker et al., (1950) eran medios definidos pero que precisaban de un suplemento de suero entre el 5 y el 20 % (Eagle, 1959; Barnes y Sato, 1980). A fin de eliminar el aporte de medios complejos no definidos se han ido formulando medios más complejos como NCTC 109 (Evans et al., 1965), 135 (Evans y Bryant, 1965), MB572/1 (Ham, 1965), Ham F10 y F12 (Ham, 1965), serie de los MCDB (Ham y McKeehan, 1978) y los medios de Sato suplementados con hormonas (Barnes y Sato, 1980). La aproximación recomendada para establecer un medio definido es empezar con un medio rico, por ejemplo Ham F12, suplementado con elevada concentración de suero (20 %) y probar suplementos que permitan reducir la cantidad de suero hasta poderla reducir o suprimir. Después de años de investigación en la composición de los medios la elección de estos sigue siendo empírica. Los principales medios empleados y sus aplicaciones son (Freshney, 2005):

1. Medio Basal de Eagle (BME). Medio elemental con sólo los aminoácidos esenciales. Se necesita siempre la suplementación con suero bovino fetal al 10 %. Crecimiento de fibroblastos de ratón y células HeLa.
2. Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM). Es el medio de uso más corriente, contiene más aminoácidos y en mayor concentración que el BME. Se usa para cada casi todo tipo de cultivos y requiere la adición de suero (10 %).
3. RPMI 1640. Medio diseñado para el crecimiento de linfoblastos y líneas celulares leucémicas en suspensión. Tiene un amplio rango de aplicaciones con suplementos adecuados.
4. Medio MEM modificado por Dulbecco (DMEM). Contiene cuatro veces la concentración de aminoácidos y vitaminas que el BME. Se usa para la selección de hibridomas suplementado con HAT o HT.
5. Modificación de Iscove del medio DMEM (IMDM). Es un medio muy completo que incluye en su formulación albúmina bovina, transferrina, selenito, etc. Es muy útil para el cultivo de linfocitos en medio libre de suero. También sirve para otros tipos celulares, pero en ese caso requiere suero a bajas concentraciones.
6. McCoy 5A. Medio diseñado para el crecimiento de líneas celulares diploides tanto de rata como humanas.
7. Medio L-15 de Leibovitz. Utilizado para el cultivo de virus.

8. Medio F-10 de Ham. Para el crecimiento de líneas celulares humanas, debe ser suplementado con proteínas y hormonas. Contiene metales como Fe, Cu, Zn. Es útil para el cultivo de células amnióticas.
9. Medio F-12 de Ham. Útil para el crecimiento de líneas celulares son suplementos proteínicos. Combinado con IMDM es un medio que se usa como libre de suero.
10. Medio 199. Muy usado para el cultivo de células no diferenciadas y estudio de cromosomopatías.

Todo medio de cultivo está formado por los siguientes elementos: 1. Soluciones salinas equilibradas (BSS); 2) Aminoácidos; 3) Vitaminas; 4) Otros suplementos orgánicos de bajo peso molecular.; 5) Hormonas y factores de crecimiento (suero) y 6) Inhibidores del crecimiento de los contaminantes (antibióticos y antifúngicos) (Freshney, 2005).

1.7.5.1.- ANTIBIÓTICOS Y ANTIFÚNGICOS

A fin de evitar el crecimiento de contaminantes en el cultivo se suele suplementar éste con sustancias antibióticas de diferente espectro de acción. La adición de antibióticos ha de ser estrictamente controlada para evitar efectos nocivos sobre el cultivo (Freshney, 2005). Es importante tener especial cuidado cuando se combinan dos o más antibióticos. Las mezclas de uso más común son:

1. Penicilina (100 U/ml) / Streptomycin (100 ugr/ml). Combinación anti-microbiana.
2. Penicilina (100 U/ml) / Streptomycin (100 ugr/ml) / Fungizona (Wittaker). Combinación anti-microbiana y anti-fúngica.
3. Gentamicina (50 ugr/ml). Anti-microbiana, conviene ir alternándola con la penicilina-streptomycin.
4. Amphotericina B (2.5 ugr/ml). Antifúngico y antilevaduras. Se han observado algunos efectos secundarios sobre el crecimiento de células de médula ósea humana en cultivo.

1.7.6 LA CÁMARA DE NEUBAUER

La cámara de Neubauer está construida en un bloque grueso de cristal con forma rectangular (como un portaobjetos). Cuatro surcos transversales tallados en el cristal delimitan cinco zonas. Además la zona central está dividida por un pequeño surco perpendicular a los anteriores. Las dos zonas externas sirven para sujetar la cámara a la platina del microscopio. Las dos zonas rectangulares angostas están delimitadas por bloques 0,1 mm más altos que la base del bloque, lo cual permite colocar un cubrecámara para delimitar el volumen en el que se realizará el recuento celular. Finalmente los dos sectores centrales configuran la región verdaderamente útil, donde están grabados dos retículos cuadrangulares de 3 mm de lado. Cada retículo consta de 9 cuadrados grandes, cada uno de 1 mm de lado y por ende de 1 mm² de superficie. Esto hace que, con el cubrecámara colocado, cada cuadrado grande represente un volumen de 0,1 mm³ lo cual equivale a 0,1 ul (10⁻⁴ ml). Los cuatro cuadrados grandes de las esquinas están divididos en 16 cuadrados medianos. En ellos debe realizarse el recuento de leucocitos, debido al tamaño que presentan estas células. El cuadrado grande central puede tener dos aspectos (Douglas. 2001). En la Cámara de Neubauer tradicional, está

dividido en 16 cuadrados medianos y cada uno de ellos se halla dividido a su vez en 25 cuadrados pequeños (400 cuadrados pequeños en total). Además la última fila y la última columna de cuadrados pequeños está dividida al medio. En cambio, en la cámara de Neubauer modificada el cuadrado grande central está dividido en 25 cuadrados medianos y cada uno de ellos está dividido en 16 cuadrados pequeños (400 cuadrados pequeños en total). Cualquiera sea la cámara empleada, este cuadrado grande central es el empleado en el recuento eritrocitario y plaquetario (Douglas 2001).

Para realizar el recuento celular, debe colocarse el cubreobjetos sobre el portaobjetos de esta cámara e introducir entre ambos la muestra celular previamente preparada. Debe evitarse que la muestra rebalse, porque si esto sucede las células a contar también se perderán. La velocidad de llenado de la cámara debe ser homogénea, evitando así una mala distribución de las células en el preparado que traerá aparejado errores en el recuento.

La muestra no debe secarse, por lo tanto es recomendable guardar la cámara de Neubauer cargada dentro de una cámara húmeda para que sedimenten las células. Luego se coloca la cámara en un microscopio óptico y se procede al conteo, eligiendo para ello los cuadrados apropiados (Gutiérrez, 1998). Se debe elegir un criterio para definir qué células se cuentan y cuáles no, cuando las mismas quedan sobre uno de los bordes del cuadrado.

Una vez contadas las células se calcula la concentración en la muestra original, considerando: la dilución de la muestra hecha para el sembrado, la cantidad de cuadrados considerados, el número de células contadas y el volumen de muestra debajo de cada cuadrado. La forma más sencilla para hacer el conteo es utilizar los cuatro cuadrados externos de arriba o abajo sumando los cuatro datos obtenidos y multiplicar por 2500 y finalmente por el número de dilución entre las células y el azul de tripano (Gutiérrez, 1998).

CAPITULO 2

2.1.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando las limitaciones que presentan las estrategias actuales para el tratamiento de la LMC, se propuso emplear una nueva alternativa basada en la Terapia Celular (TC), específicamente con el uso de CD3(+)CD56(+) por su actividad citotóxica y citolítica empleando para células K562 como inductores de células leucémicas en un modelo de cultivo celular *in vitro*.

Por lo tanto, se planteó la siguiente pregunta:

¿Cuál sería el impacto de la Terapia Celular (empleando CD3(+)CD56(+)) como terapéuticas para inhibir la LMC inducida con células K562 en los modelos experimentales que serían probados?

2.2.- JUSTIFICACIÓN

En cierto sentido, esta investigación: Terapia Celular (TC) en modelos de leucemia mielocítica crónica (LMC) inducida *in vitro* con el empleo de CD3(+)CD56(+) con células K562 representa una larga respuesta a una pregunta breve: ¿se pudo determinar el efecto de la Terapia Celular (TC) en los modelos celulares experimentales con leucemia mielocítica crónica?

Desde hace varias décadas en el mundo, el cáncer se ha convertido en un problema de salud pública, por ser el responsable de millones de muertes. Por tanto, se ha generado de esta forma un creciente interés para estudiarlo como enfermedad compleja (multifactorial), tomando individualmente el componente genético y ambiental, para entender las interacciones gen-proteína-ambiente, que modulan los diversos mecanismos celulares y moleculares que intervienen en la oncogénesis. Lo anterior permite diseñar nuevas herramientas diagnósticas que posibiliten la detección temprana de la neoplasia y un seguimiento continuo y oportuno del tratamiento; también la creación de nuevos fármacos anti-neoplásicos dirigidos contra blancos terapéuticos más específicos, que disminuyen los efectos colaterales ocasionados por la terapia anticancerosa, igualmente, con estas nuevas drogas han permitido establecer nuevas estrategias terapéuticas que aumentan la respuesta al tratamiento y la probabilidad de remisión del paciente con cáncer.

Por tal razón, es de gran importancia que los grandes adelantos realizados por la investigación básica y aplicada estén al alcance de la comunidad clínica mexicana, para aumentar la calidad de vida de los pacientes con cáncer, específicamente con leucemia mielocítica crónica. Por primera vez en el departamento de la Ingeniería Biomédica de la UPAEP tiene como uno de los principales objetivos, el estudio de los mecanismos citotóxicos, citolíticos y apoptóticos de CD3(+)CD56(+) con K562 para la leucemia mielocítica crónica (LMC) con el enfoque de la terapia celular. Actualmente, en esta investigación se implementó la técnica de ensayo del Reactivo WST-1 de la Proliferación Celular (Cell Proliferation Reagent WST-1) para el estudio, análisis y descripción de los cultivos de modelos celulares de CD3(+)CD56(+) con la K562 de la LMC.

En México un país que ocupa la octava economía del mundo el tratamiento de la leucemia mielocítica crónica no ha sido una prioridad de investigación científica desde el punto de vista de la terapia celular. Sin embargo, en nuestro país la leucemia mielocítica crónica es una neoplasia importante significando de 15-20% de los casos de leucemia con una incidencia anual de 1 a 2 casos por 100,000 personas (Reboloso et al., 2004).

Con esta investigación se trató de destacar los beneficios de la aplicación de la terapia celular en modelos celulares in vitro para el posterior desarrollo en modelos animales y en in vivo. La Inducción de la leucemia mieloblastica crónica utilizando células K-562 (leucemia humana, mielocítica crónica) en los cultivos celulares de linfocitos (Estudio In Vitro) permitió estudiar, analizar y describir los mecanismos citotóxicos y citolíticos de CD3(+) CD56(+) contra leucemia mieloide crónica con la finalidad de experimentar el efecto apoptótico de estas líneas celulares y su efectividad in vitro para el tratamiento de la LMC.

Es paradigmática bioéticamente la creación, aplicación experimental y terapéutica de un modelo de terapia celular, sin embargo, los estudios in vitro en los modelos celulares linfocíticos permitieron y apoyaron planear ejecutar los experimentos en modelos animales y en vivo (en seres humanos) en pacientes que cursan con la leucemia mielocítica crónica para el próximo futuro.

2.3.- PREGUNTAS DE INVESTIGACION

- 1) ¿Son las células K-562 (leucemia humana, mielocítica crónica) apropiadas para inducir leucemia mieloblastica crónica en los cultivos celulares de linfocitos (Estudio In Vitro)?
- 2) ¿En que consiste el estudio y análisis del efecto apoptótico de CD3(+)CD56(+) in Vitro para el tratamiento de la LMC?
- 3) ¿Producirá efectos terapéuticos significativos de terapia celular la Inducción de leucemia mieloblastica crónica con células K-562 en los modelos celulares in vitro?

2.4.-HIPÓTESIS DE INVESTIGACIÓN

Existe el efecto de la Terapia Celular (TC) empleando CD3(+)CD56(+) en un modelo in Vitro con leucemia inducida con células K562.

2.5.- OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de la Terapia Celular (TC) empleando CD3(+)CD56(+) en un modelo in vitro con leucemia inducida con células K562.

2.6.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Inducir leucemia mieloblastica crónica utilizando células K562 en un cultivo de células: CD3(+)CD 56(+) (Estudio In vitro)
- 2) Estudiar el mecanismo citotóxico y citolítico de CD3(+)CD56(+) con K562.

- 3) Estudiar y analizar el efecto apoptótico de CD3(+)CD56(+) y su efectividad in vitro para el tratamiento de la LMC.

2.7. - MATERIALES Y METODOS

2.7.1.- MATERIALES

Agitador magnético (SBS)
 Autoclave (Selecta, Autotester)
 Balanza (Denver)
 Balanza de precisión (Gibertini)
 Baño (Bunsen)
 Cámara de flujo laminar (Flow Lab)
 Cámara de recuento celular (Neubauer)
 Centrifuga (Sigma)
 Congelador de -80°C (Giralt)
 Congelador de -20°C
 Contenedores de Nitrógeno líquido
 Destilador de Agua (Millipore)
 Estufa (Selecta)
 Estufa de cultivo (Forma Sientific)
 Filtro (Millipore)
 Frascos de Cultivo
 Guantes desechables
 Jeringuillas estériles
 Lector de ELISA (das Plate Reader)
 Micropipetas (Gilson)
 Papel de filtro
 PHmetro (Crison)
 Placas de cultivo de 6 y 96 pocillos
 Pipetas desechables de 5 y 10 ml
 Pipetas multicanales
 Pipetas Pasteur
 Tubos eppendorf de 1.5 ml
 Tubos universales de 25 ml y 50 ml

2.7.2.- TAMPONES, MEDIOS Y SOLUCIONES

Medio RPMI 1640 (Gibco)
 Tampón PBS (Phosphate Buffered Saline Solution): 10 mL
 Na_2HPO_4 , 170mM NaCl, 3mM KCl, pH:7.2
 PBS-EDTA: 0.2 g/l de EDTA en PBS

2.7.3. - MÉTODOS DE CULTIVO CELULAR

2.7.3.1.- CULTIVOS CELULARES DE K562

El material biológico fue K562 proporcionado por la Colección alemana de microorganismos y de los cultivos de células (DSMZ, Brunswick) y American Type Culture Collection (ATCC). Las células fueron cultivadas en RPMI-1640 suplementado con 10% Suero Bovino Fetal (SBF) inactivado (Gibco, EE.UU.), 20µL de penicilina/estreptomicina/anfotericina a 37°C en una atmósfera plenamente humidificado de 95% de aire y 5% de CO₂.

2.7.3.2- CULTIVO CELULAR DE CD3(+)

Las células CD3(+) se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) inactivado (Gibco, EE.UU.), 20µL de penicilina/estreptomicina/anfotericina, 2 mmol/L l-glutamina y 50 µmol/L 2-mercaptoetanol a 37°C en una atmósfera plenamente humidificado de 95% de aire y 5% de CO₂.

2.7.3.3.- CULTIVO CELULAR DE CD56(+)

Las células CD56(+) se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) inactivado (Gibco, EE.UU.), 20µL de penicilina/estreptomicina/anfotericina, 2 mmol/L l-glutamina y 50 ug/ml de gentamicina a 37°C en una atmósfera plenamente humidificado de 95% de aire y 5% de CO₂.

2.7.4.- CONGELACIÓN DE LAS CÉLULAS

Para conservar las líneas celulares durante un largo período de tiempo, se congelan las células en nitrógeno líquido. El proceso consiste en centrifugar las células a 200xg en frascos universales durante 5 minutos y resuspenderlas en suero fetal bovino inactivado con un 10% de DMSO (dimetil-sulfóxido). Se distribuyen en criotubos y se introducen rápidamente en el congelador de - 80°C, pasándose a las 24h a nitrógeno líquido. Para descongelarlas se introducen en un baño a 37°C y posteriormente se lavan dos veces con PBS estéril, para eliminar los restos de DMSO. Por último, son resuspendidas en medio de cultivo y depositadas en frascos de cultivo.

2.7.5.- LAVADO DE LAS CÉLULAS

Esta operación se realiza para retirar los restos de medio de cultivo cuando las células van a ser sometidas a algún experimento posterior o cuando las células van a ser congeladas. Se centrifugan las células a 200xg durante 5 minutos y al botón celular se le añade 20ml de PBS estéril, volviéndose a centrifugar.

2.7.6.- PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE CELULAS MONONUCLEARES

Se ha realizado la esterilización de Campana de Flujo Laminar: primero con alcohol de 96° C y luego con el benzal. Se prepararon los materiales para el cultivo celular: RPMI, penicilina/estreptomicina/anfotericina, placas de petri, pipetas, micro pipetas, tubos eppendoff, tubos cónicos de 15ml y de 50 mL (estériles), mechero y otros. Muestra de sangre periférica (PBMNCs) de un donante normal se obtuvo después de consentimiento informado. Se depositó cuidadosamente 3mL Ficoll Histopaque 1.119 en un tubo de centrifuga de 15mL y se extendió de igual manera 3mL de histopaque 1.078 sobre este. Y, luego se extendió cuidadosamente 6 ml de sangre total sobre el gradiente superior del tubo. Fueron centrifugados a 2500 RPMI durante 30 minutos. La interfase que corresponde a células mononucleares fue colectada, lavada con PBS y centrifugada durante 5 minutos a 1500 rpm. Las células mononucleares se cultivaron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF) inactivado (Gibco, EE.UU.), 20µL de penicilina/estreptomicina/anfotericina, 2 mmol/L l-glutamina y 50 µmol/L 2-mercaptoetanol a 37°C en una atmósfera plenamente humidificado de 95% de aire y 5% de CO₂.

2.7.7.- PROCEDIMIENTO DE CULTIVO CELULAR EN GENERA

Durante la centrifugación para la separación de la sangre total se preparó el medio de cultivo que fue de acuerdo en cantidad con el número de cultivo que se desea. En esta investigación para un cultivo en una caja de petri de 50mm, se agregaron los siguientes: 6.7ml de RPMI, 300 µL de SBF (suero bovino fetal), 20 µL de penicilina/estreptomicina y 20 µL de anfotericina (contra el micoplasma). Todos los anteriores se multiplicaron por 2, 3, etc., por los números de cultivo que se requirieron. Cuando terminó la centrifugación, se retiró con cuidado los tubos de la centrifuga y se observaron claramente dos capas: mononucleares (linfocitos y monocitos) y polinucleares o granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos). Se aspiró y desechó el sobrenadante hasta 0.5cm de la capa A, transfiriendo células a un tubo marcado "mononuclear". Se lavó las células por separadas añadiendo 1 ml de PBS (solución salina isotónica tamponada con fosfato a los tubos de ficoll de 15ml, y centrifugar durante 10 minutos a 200 x g que es equivalente a 1500 RPMI. Se retiró el sobrenadante y desecharlo. Lo anterior se repitió dos veces. Y, otra vez se suspendieron las células en un tubo ficoll de 15 ml (volumen apropiado) con 1ml de solución salina isotónica tamponada con fosfato para después realizar varios ensayos de investigación.

2.7.8.- CUENTA CELULAR TOTAL

Se añaden 90 µL (por ejemplo) de la suspensión celular recogida previamente en tubos empendorf y 10 µL de azul de tripano; el azul de tripano es un colorante utilizado para el recuento de células íntegras por exclusión de dicho colorante. Este método esta basado en que las células vivas (viables) no captan el azul de tripan mientras que las células muertas (no viables) si lo hacen. Se cuentan como muertas las células teñidas de

azul y como vivas las refringentes. se mezcla bien y se incuba 3 minutos. (Nota: tiempos muy largos de exposición al colorante pueden hacer que las células vivas acaben por captar también éste). Para hacer el recuento celular en la cámara de Neubauer, Para ello se añade una pequeña cantidad de la mezcla de células y azul de tripano sobre la porta y se coloca un cubreobjetos sobre la muestra. Una vez enfocadas las cuadrículas se cuentan las células que hay en los recuadros divididos en 16 cuadrículas (ver figura 28: recuadros L).

Amplificación de una cámara del hemocitómetro (Neubauer)

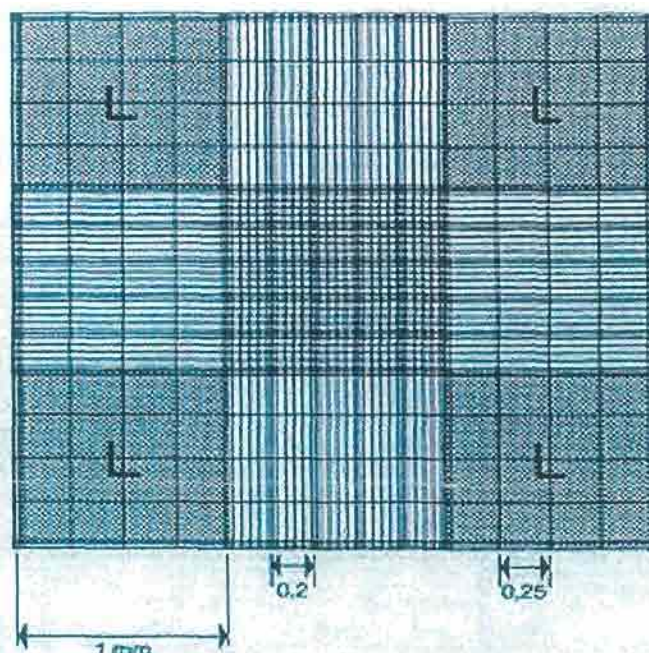


Figura 28: Una cámara del hemocitómetro (Neubauer)

Conjunto de 16 cuadrículas (L)

Volumen de recuento = 1 mm x 1 mm x 0,1 mm 1 mm

$V = 0,1 \text{ mm}^3 = 10^4 \text{ cm}^3$

La media aritmética de los 4 recuentos efectuados (las 4 L), multiplicada por el factor de la cámara (10.000) y por el factor de dilución (100/90) ofrece la concentración de células en la muestra (Nº células / mL). Si se cuentan las cuatro áreas sombreadas (L) observando un total de x células entre las cuatro áreas, la concentración en la suspensión celular será:

Concentración en la suspensión (células / mL) = $10000 (x/4)$

En la imagen se puede observar el aspecto de una de las regiones marcadas como L y que en el microscopio se ven como una cuadrícula de 16 pequeños cuadrados de 0.25 milímetros de lado. Esta imagen ha sido tomada empleando un microscopio invertido de contraste de fases.

Diagrama que indica las células que deben ser contadas

Célula que debe ser contada ○

Célula que no debe ser contada ●

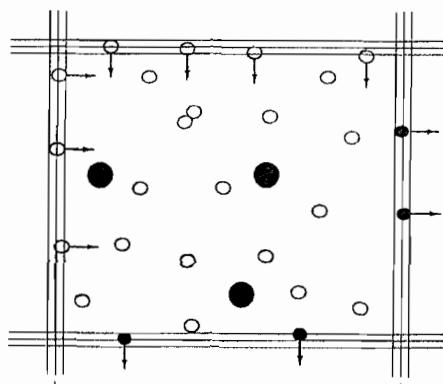


Figura 29: Diagrama de conteo celular

Se realizó la cuenta celular total de las células mononucleares separadas por centrifugación con medio de gradiente utilizando una cámara de Neubauer. Las células fueron suspendidas con azul de tripano al 0.4% w/v en una proporción de 1:4 (25 μ l de células y 75 μ l de azul de tripano) y se colocaron 10 μ l de la suspensión dentro de la cámara. Las células fueron contadas en los cuatro cuadrados externos, se sumaron los resultados multiplicando el total por 2500 y luego por 4 para obtener el resultado final del conteo. Así fueron realizados todos los conteos celulares en esta investigación.

2.7.9.- SEPARACIÓN DE CÉLULAS CD3+ Y CD56+ A PARTIR DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMC)

2.7.9.1.- SEPARACIÓN DE CD3(+)/CD56(+)

Se obtuvo la cantidad de 6 ml de sangre de un sujeto sano después de consentimiento informado para la separación de dos poblaciones celulares específicas, las células CD3(+) y las células CD56(+) a partir de células mononucleares de sangre periférica con la utilización de perlas magnéticas para cada una de ellas (Miltenyi Biotec, GmbH).

El paquete celular fue resuspendido a una concentración de 1×10^7 células en 80 μ l de buffer PBS pH 7.2, 0.5% BSA y 2 mM EDTA y se adicionó 20 μ L de CD3 MicroBeads (Miltenyi Biotec, GmbH) por cada 1×10^7 células, la mezcla fue incubada durante 15 minutos a 4-8°C (refrigerador). Al término de la incubación las células fueron lavadas adicionando 1-2 ml de buffer por cada 10^7 células y centrifugadas a 300xg por 10 minutos. El sobrenadante fue descartado y se resuspendió en 500 μ L de buffer hasta 10^8 células. Esta suspensión fue cargada dentro de la columna MS que se encontraba ya dentro del magneto MiniMACS y había sido prelavada con 500 μ l del mismo buffer. Posteriormente se realizaron 3 lavados con 500 μ l cada uno de buffer.

Las células no marcadas que eluyeron primero a través de la columna junto con las recuperadas en los lavados, fueron recolectadas para un subsecuente procesamiento.

La columna fue removida del magneto y se colocó en un nuevo tubo estéril de 15 mL, se adicionó 1 ml de buffer en el interior de la columna y con una aplicación firme y rápido del émbolo se recuperaron las células que habían sido retenidas magnéticamente. Esta fracción corresponde a las células CD3(+) contenidas en la muestra.

En cuanto a la fracción negativa recolectada, esta fue procesada para la separación de células CD56(+). Las células fueron recuperadas por centrifugación a 300xg, 10 min a 4°C y contadas nuevamente con azul de tripano en la cámara de Neubauer. Posteriormente el paquete celular fue resuspendido en 80 µl de buffer PBS pH 7.2, 0.5% BSA y 2 mM EDTA por cada 1×10^7 células y se adicionó 20 µl de CD56 MicroBead por cada 1×10^7 células. El resto del proceso de separación se ha realizado como se describió anteriormente.

Las dos poblaciones de células CD3(+) y CD56(+) separadas fueron almacenadas a 4°C para realizar al día siguiente los ensayos de citotoxicidad y apoptosis.

2.7.10.- CULTIVOS IN VITRO

2.7.10.1.- OBTENCIÓN DE MUESTRA

Se obtuvo sangre fresca periférica total de 5 ml en un tubo preservativo de 6 ml diluido con la heparina (EDTA), mínima suficiente (alfa MEM; Gibco, Grand Island, NY, USA), de un sujeto normal de 22 años de edad después de consentimiento informado.

2.7.10.2.- PROCEDIMIENTO

En un tubo cónico de centrifuga, de 15ml, se depositaron los dos gradientes de Ficoll-Histopaque de densidades diferentes, una que se colocó primero de densidad 1.119 y otra que se colocó lentamente sobre la anterior, de densidad 1.078. Sobre estos dos colchones de Ficoll-Histopaque de 3ml de volumen cada uno, se añadió muy suavemente otros 3ml de sangre diluida 1:1 en PBS, que ha sido obtenida estérilmente por venopunción en tubo que contenía EDTA. La sangre diluida se dejó resbalar por las paredes del tubo para que se depositara sobre el gradiente de Ficoll de densidad 1.078. El tubo se centrifugó a 2500 RPMI durante 30 minutos a temperatura ambiental. Tras la centrifugación se observaron dos halos opacos en la interfase: el superior correspondiente a las células mononucleares y el inferior a las polinucleares. Se recogió el halo de mononucleares y se lavaron las células con 2 ml de RPMI (normalmente tres veces) (aunque muchos otros investigadores han usado PBS) durante 10 minutos a 1500 RPMI para obtener las células mononucleares (pellete o pastilla). Se resuspendió en 2 mL de RPMI para su posterior cultivo. Se colocó 1mL de las células disueltas en RPMI a cada caja de petri y se observaron las dos cajas bajo microscopio para asegurar la presencia de células. Posteriormente, se añadieron al medio RPMI 1640 con 6.7 mL de cada caja (un total de 7.7 ml), 300 µL de suero bovino fetal (SFB) al 10% y 20 µL de

penicilina/estreptomicina/anfotericina (Sigma). Bien disuelto con las mismas punta se etiquetó cada caja petri con nombre y fecha y se metieron a la incubadora.

2.7.10.3.- CONTEO DE CÉLULAS EN LA CÁMARA DE NEUBAUER

Se preparó la cámara de Neubauer colocando un cubreobjeto sobre la cámara. Con una pipeta Pasteur, se colocaron 10 μl de las células entre la cámara de Neubauer y el cubre objetos. Se dejó reposar las células durante un par de minutos (2 minutos) y se observó al microscopio con un objeto de 40x. Se contó el número de células observados en los 4 cuadrados externos, sumando los resultados, multiplicando por 2500 y finalmente por 4 (el número de dilución). Se utilizó la siguiente formula:

$$N \times 2500 \times 4$$

La suma total de número de células contadas en los cuatro cuadrados externos $\times 2500 \times 4$.

Donde: N: es la suma total de las células contadas en los 4 cuadrados externos (4 arriba o 4 abajo).

2500: es el número estándar, factor para pasar el número de células en el cuadrado central (volumen = $0.1\text{mm}^3 = 0.1\text{ml}$) a número de células por ml ($1000\text{mm}^3 = 1000\text{mL}$ y 4: factor de dilución.

2.7.10.4.- ANÁLISIS DE VIABILIDAD

Se preparó una solución de azul de tripano al 0.4% en PBS (no hubo necesidad de filtración y se colocó 10 μl de células en un tubo de 3 mL. Se añadieron los siguientes: 40 μl de PBS, 50 μl de azul de tripano y se mezcló las dos sustancias. Se dejó incubar durante 5 minutos a temperatura ambiental y posteriormente se tomó 2 μl de la mezcla y colocarlos en una cámara de Neubauer y observar al microscopio con objeto de 40x. Se observó cada cuadrado anotando el número de células y omitiendo a aquellas muertas (teñidas de azul marino). Se tuvo que realizar el conteo en menos de 5 minutos (pues pasado este tiempo la mortalidad aumenta por el propio colorante. Finalmente se calculó el porcentaje de viabilidad con la formula descrita anteriormente.

2.7.11.- REALIZACIÓN DE LAS CURVAS DE CRECIMIENTO CELULAR

Se ha realizado el analisis de las curvas de crecimiento de las células K562, CD3(+) y CD56(+) con el objetivo de conocer la capacidad de expansión celular de cada una de las células así como para conocer la densidad celular de cada una.

2.7.11.1.- CURVA DE CRECIMIENTO CELULAR DE K562

En una placa de doce pozos, se depositó 20 μL de células K562 (73,746 de concentración o densidad) con RPMI, BSA 0.1%, penicilina/estreptomicina/anfotericina sin SBF (arresto celular) a cada pozo de 3mL (después de conteo con la cámara de Neubauer). Se lavaron 3 pozos por cada experimento de conteo celular. Posteriormente se procedió a la realización de conteo celular de K562 cada doce horas: 7:45 PM y 7:45 AM en el primer día y el siguiente a las 7:45 PM y 7:45 AM con la técnica de colección, suspensión y centrifugación.

2.7.11.2.- CURVA DE CRECIMIENTO CELULAR DE CD3(+)

En una placa de 96 pocillos se depositaron 30 μL de CD3(+) equivalente a 71,7 de concentración o densidad con RPMI, BSA 0.1%, penicilina/estreptomicina/anfotericina sin SBF (arresto celular) a cada pozo de 300 μL (después de conteo con la cámara de Neubauer). Se lavaron ocho pocillos por cada experimento para el conteo celular cada hora durante un periodo de cuatro horas.

2.7.11.3.- CURVA DE CRECIMIENTO CELULAR DE CD56(+)

En una placa de 96 pocillos se depositaron 30 μL de CD56(+) equivalente a 25.2 de concentración o densidad con RPMI, BSA 0.1%, penicilina/estreptomicina/anfotericina sin SBF (arresto celular) a cada pozo de 300 μL (después de conteo con la cámara de Neubauer). Se lavaron ocho pocillos por cada experimento para el conteo celular cada hora durante un periodo de cuatro horas.

2.7.12.- ANALISIS DE ABSORBANCIA DE CD3(+), CD56(+) Y K562

En una placa de 96 pocillos se depositaron 100 μL de CD3(+), CD56(+) y K562 cada una suplementado con 10 μL de WST1 a un pocillo de 300 μL de la siguiente manera: CD3(+) en la primera columna seguida de CD56(+) y K562. Así sucesivamente durante cuatro veces para lograr que cada célula tenga cuatro columnas para un total de treinta y dos pocillos. El experimento fue diseñado para un periodo de cuatro horas. Se calculó la absorbancia y proliferación celular cada hora por un periodo de cuatro horas.

2.7.13.- EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO (ABSORBANCIA) DE CÉLULAS CD3(+) CD56(+) EN CÉLULAS K562.

Se ha realizado la lectura de ELISA de una placa de 96 pocillos en Plate Reader (das USA) para evaluar la absorbancia de CD3(+) y CD56(+) con K562 con una baja concentración celular de ambas.

2.7.14.- EFECTO APOTÓTICO DE LAS CÉLULAS CD3+ CD56+ SOBRE LAS CÉLULAS K562

En una placa de 96 pocillos se depositaron 30 μ L de CD3(+) equivalentes a 71.7 células, 95 μ L de CD56(+) equivalente a 78.3 células (un total de 150 células) y 40 μ L de K562 (equivalente a 150 células) cada una suplementado con 10 μ L de WST1 a un pocillo de 300 μ L de la siguiente manera: CD3(+) en la primera columna seguida de CD56(+) y K562. Así sucesivamente durante cuatro veces para lograr que cada célula tenga cuatro columnas para un total de treinta y dos pocillos. Y se repitió el mismo diseño para tener un total de 300 células de CD3(+) y CD56(+) sobre 300 células de K562 en una segunda placa de 96 pocillos (en este último se utilizó una medición aproximada de células por microlitro). El experimento fue diseñado para un periodo de dos horas. Se calculó la absorbancia y proliferación celular cada hora por un periodo de dos horas.

La fragmentación del DNA nuclear es uno de los aspectos moleculares de la apoptosis mejor definidos, se ha considerado la causa desencadenante de todo el proceso de apoptosis y el responsable de las manifestaciones morfológicas. Aunque se han descrito casos en los que aparecen estas mismas manifestaciones sin rotura del DNA; pero en la mayoría de ocasiones el DNA aparece fragmentado y, de hecho, se utiliza esta fragmentación como indicador de muerte celular por apoptosis aunque no es exclusivo.

La prueba del cometa, también conocida como electroforesis Alcalina de Células Individuales (SCG: Single Cell Gel Electrophoresis Assay), es una prueba que evalúa el daño del material genético. El daño es representado por un aumento de fragmentos del ADN que migran fuera de las células del núcleo bajo una forma característica similar a la cola de un cometa; estos fragmentos son generados por rompimientos del ADN.

El ensayo Cometa consiste en el análisis de células individuales que son lisadas y se someten a una electroforesis, para así lograr que los fragmentos de cromosomas corran hacia el ánodo y se revelen como la cola de un cometa.

3.- RESULTADOS

3.1.- OBTENCIÓN DE CELULAS MONONUCLEARES

Los resultados fueron en orden superior de tubo cónico de 15ml hacia inferior se obtuvieron: plasma y luego (A) Células mononucleares: linfocitos y monocitos, histopaque 1.078, (B) Células granulocíticas: neutrófilos, eosinófilos y basófilos; histopaque 1.119 y (C) Eritrocitos.

3.2.- ANALISIS DE ABSORBANCIA DE CD3(+), CD56(+) Y K562

Para este efecto se hizo los conteos celulares de cada una de las células. El resultado de conteo celular de CD3(+) fue de 2,390,000 células/mL, mientras tanto de CD56(+) era de 840,000 células/mL. Con 71.7 células/ μ L de CD3(+) y 25.2 células/ μ L de CD56(+) no pudieron inhibir la proliferación celular de K562 debido a la baja concentración celular de ambas. Sin embargo hubo más proliferación celular de K562. Ver Tabla 2:

Tabla 2: Absorbancia de CD3(+), CD56(+) y K562

ABSORBANCIA	CD3(+)	CD56(+)	K562
PROMEDIO DE ABSORBANCIA	0.049	0.046	0.584
PROMEDIO DE ABSORBANCIA	0.050	0.049	0.614

3.3.- EFECTO DE CITOTOXICIDAD Y CITOLITICA DE CD3(+) Y CD56(+) SOBRE K562 CON AUMENTO CELULAR DE 150 Y 300 POR MICROLITRO

Con el aumento de la concentración de CD3(+) y CD56(+) a 150 células/ μ L, hubo una ligera inhibición de la proliferación celular de K562. Sin embargo con la concentración de 300 células/ μ L de CD3(+) y CD56(+), hubo una inhibición importante sobre K562. Sin embargo, no hubo ninguna respuesta sobre la K562 sin tratamiento celular. Ver figura 30:

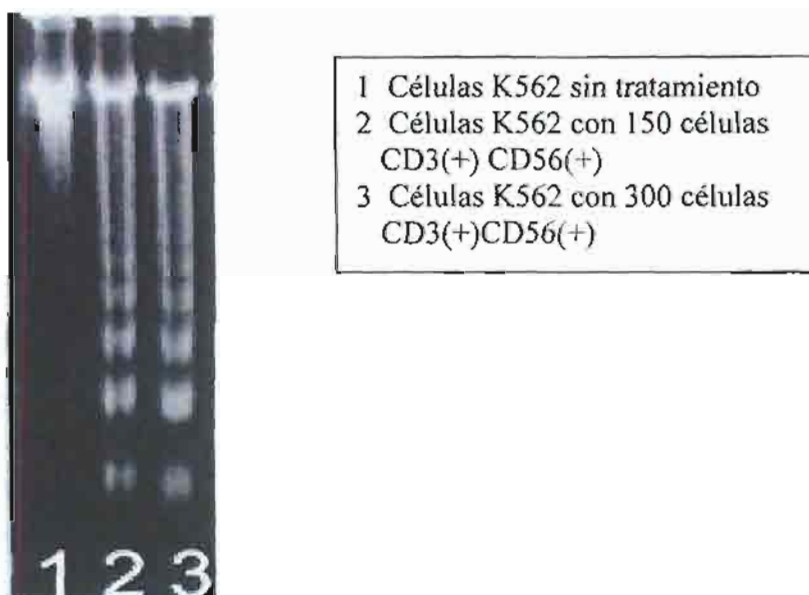


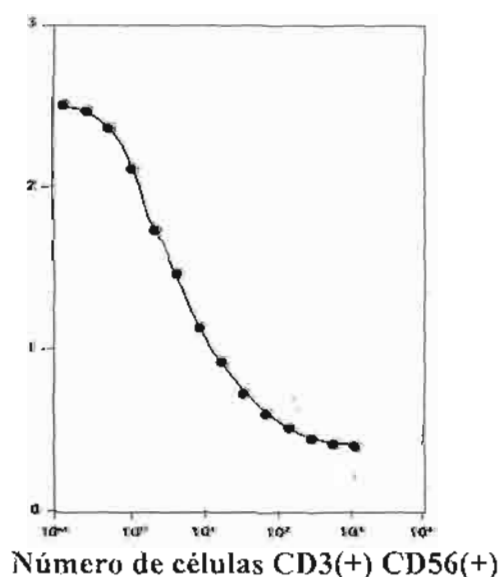
Figura 30: Efecto apoptotico de CD3+CD56+ sobre K562

Como puede observarse en el gel, las células K562 que fueron puestas en contacto con las células CD3(+)CD56(+) muestran fragmentación de su DNA. Lo cual sugiere la inducción de apoptosis sobre las células K562.

3.4.- EVALUACIÓN DEL EFECTO CITOTÓXICO (ABSORBANCIA) DE CÉLULAS CD3(+) CD56(+) EN CÉLULAS K562.

Se construyó una gráfica con las medidas de absorbancia en cada una de las muestras de CD3(+) y CD56(+).

Absorbancia ($A_{430nm} - A_{630nm}$)

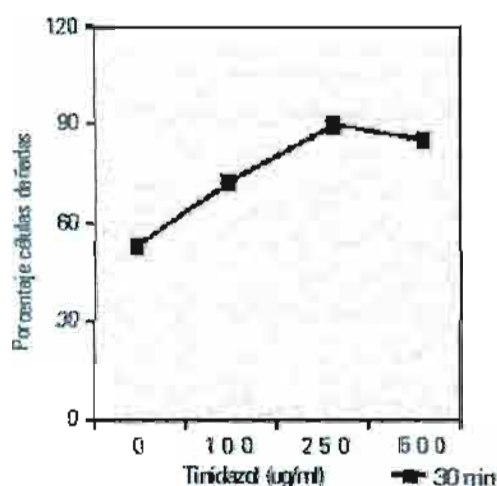


Gráfica 1: Absorbancia entre 430 nm y 630 nm

Los resultados encontrados muestran que las células CD3(+)CD56(+) ejercen un efecto citotóxico sobre las células K562, observándose que cuando se incrementa el número de células el efecto citotóxico aumenta en las células K562 hasta llegar a un punto de saturación. La absorbancia es el filtro que permite detectar el cambio colimétrico de la reacción de proliferación celular o apoptosis.

3.5.- EFECTO APOTÓTICO DE LAS CÉLULAS CD3(+) Y CD56(+) SOBRE LAS CÉLULAS K562

Se construyó una gráfica con las medidas de efecto apoptotico de CD3(+)CD56(+).



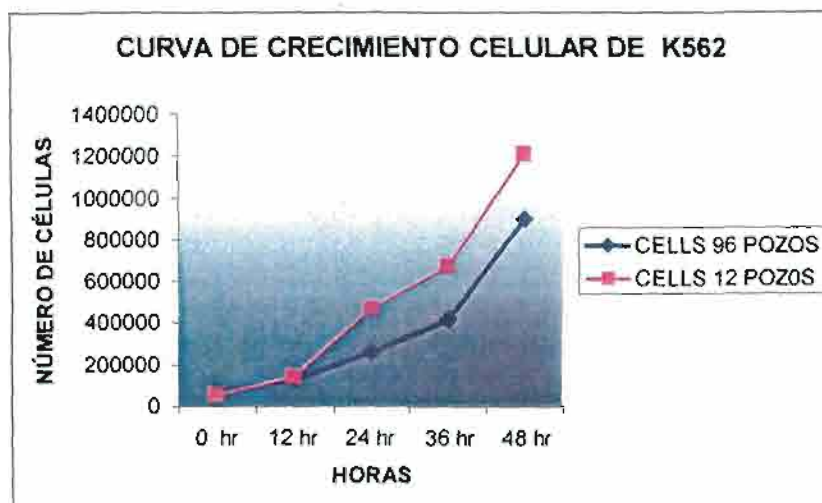
Número de células CD3(+) CD56(+)

Gráfica 2: Efecto apoptótico de las células CD3(+)CD56(+) sobre las células K562

Al evaluar el efecto apoptótico de las células CD3(+)CD56(+) sobre las células K562 se encontró que el porcentaje de células dañadas se incrementa con el número de células CD3(+)CD56(+) mostrando un máximo en 300 células/μL de CD3(+) CD56(+).

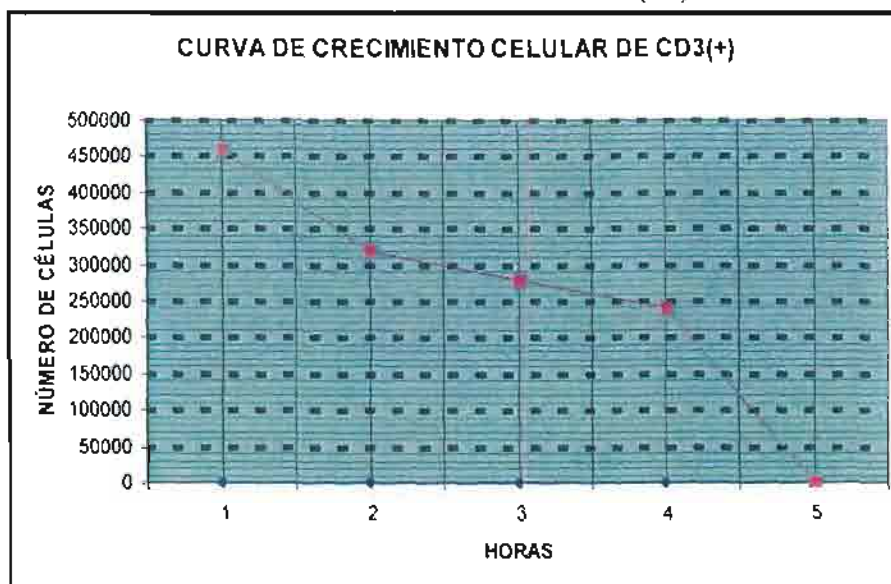
Para corroborar la inducción de apoptosis, se realizó una electroforesis en gel de agarosa con el DNA aislado de las células K562 expuestas a un determinado número de células CD3(+)CD56(+) para visualizar la fragmentación de DNA.

Gráfica 3: CURVA DE CRECIMIENTO CELULAR DE K562



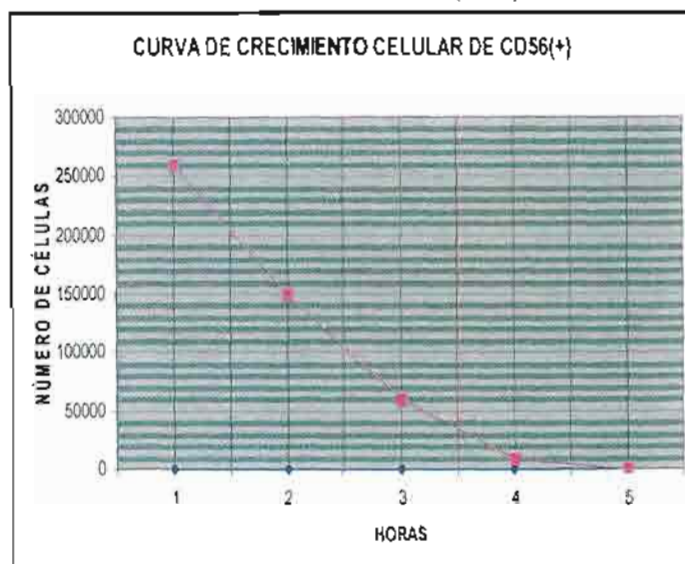
En la gráfica se observa que a las 12 horas el crecimiento es similar tanto el placa de 96 (11.4mm^2) como en la de 12 (0.3cm^2). Las células K562 crecen mucho más rápido en un medio más amplio y adecuado.

Grafica 4: Curva de crecimiento celular de CD3(+)



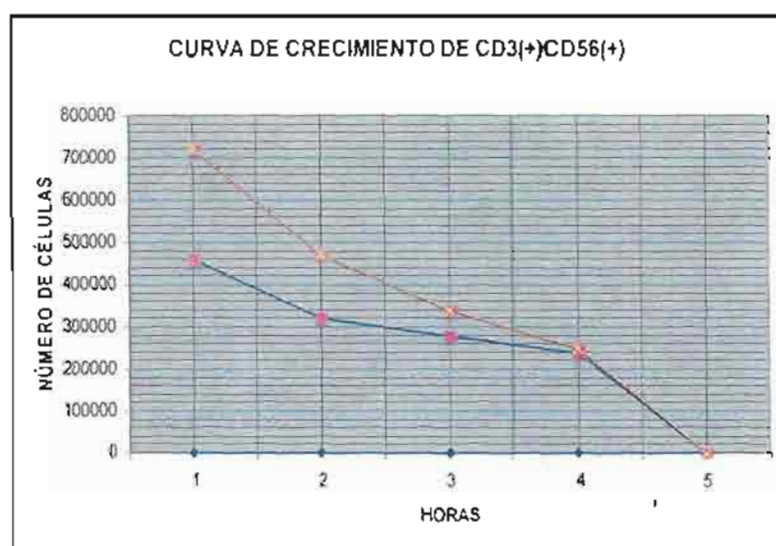
Como se puede notar el crecimiento disminuye drásticamente en un periodo de una hora. Esto se debe a que hay baja concentración y posiblemente la falta de algún factor de crecimiento celular.

Gráfica 5: Curva de crecimiento celular de CD(56+)



Como se puede observar el crecimiento disminuye drásticamente en un periodo de una hora. Esto sugiere que el cultivo necesita más concentración celular y factores de crecimiento.

Gráfica 6: Curva de crecimiento celular de CD(3+)CD(56+)



Las dos células disminuyen en crecimiento drásticamente en un periodo de una hora. Esto sugiere que el cultivo de cada una necesita más concentración celular y factores de crecimiento.

4.- DISCUSION

La complejidad de la sangre humana es verdaderamente extraordinaria. El reto de repararla cuando falla es, pues, igual de extraordinario. Sin embargo, la emergente tecnología que ofrecen las células madre abre nuevas posibilidades con las que luchar contra muchas de las enfermedades de la sangre que actualmente no disponen de tratamiento alguno. Las aplicaciones clínicas totalmente controladas y eficaces quedan aún lejos, pero los conocimientos sobre las propiedades y las capacidades de las células madre crecen enormemente día tras día y apuntan hacia futuras terapias realmente viables.

La LMC tiene características comunes bien establecidas. Es una enfermedad poco frecuente antes de los 20 años de edad, no así en décadas sucesivas. La aparición de esta enfermedad es insidiosa y es a menudo un hallazgo de un análisis de sangre es un paciente en anemia o esplenomegalia (Brunner, 1984). Razon por la cual el paciente puede cursar meses asintomático y llegar a consulta quizás por cualquier otra afección. La fatiga fácil y el malestar general, son síntomas comunes. Es conocido también que en los exámenes de laboratorio es frecuente el registro de anemia discreta o moderada, y que tanto la leucocitosis como la trombocitosis son corrientes.

Desde el punto de vista de TC, La Leucemia Mielocítica Crónica (LMC) es una enfermedad mieloproliferativa caracterizada hematológicamente por una leucocitosis marcada, basofilia y eosinofilia; la leucocitosis es debida primariamente a un aumento en neutrófilos maduros e inmaduros, la leucemia mielocítica crónica es una enfermedad clonal asociada en virtualmente todos los casos con una traslocación de los Cromosomas 9; 22 y se manifiesta con el cromosoma Philadelphia (Ph) y/o evidencia molecular de una traslocación del oncogene AVL (Virus de Leucemia Ableson) del Cromosoma 9 a un punto de quiebre de la región BCR del Cromosoma 22 (Lyons, 1999).

En la presente tesis se aportan datos que apoyan la posibilidad de desarrollar terapia celular para enfermedades leucémicas a partir de células madre. Se demuestra que es posible controlar el destino fenotípico de las células madre y que la aplicación de las células CD3(+)CD56(+) *in vitro* son factibles. En concreto, se ha desarrollado un procedimiento para la generación *in vitro* de una población homogénea de células mononucleares a partir de una línea de progenitores de la sangre periférica mediante la manipulación externa del medio de cultivo. El procedimiento se basa en la selección de las células sin una manipulación genética. Las CD3(+)CD56(+) inducen citotoxicidad y apoptosis sobre las K562. Estas células CD3(+)CD56(+) podrán ser administradas en el futuro a los pacientes con leucemia mielocítica crónica.

Los tratamientos cancerosos convencionales han mejorado sin cesar durante las últimas décadas, pero sigue siendo necesaria la búsqueda de estrategias terapéuticas suplementarias y complementarias. Los objetivos terapéuticos en oncología son aumentar la supervivencia de los pacientes y evitar o paliar los efectos adversos que deterioran su calidad de vida. Los abordajes más prometedores son el bloqueo de la neoangiogénesis, la modulación de las enzimas que degradan la matriz y los procedimientos inmunoterapéuticos dirigidos a antígenos tumorales diana definidos molecularmente. El tratamiento médico de la leucemia mielocítica crónica en el futuro debe asentarse sobre unas bases racionales del conocimiento de la proliferación, diferenciación y apoptosis.

En este contexto de búsqueda de nuevos métodos terapéuticos oncológicos se situa a las CD3(+)CD56(+) células obtenidas de las células mononucleares de la sangre periférica.

El estudio de la viabilidad y la proliferación celular es un factor importante para evaluar las respuestas de una población celular a factores externos como factores de crecimiento, antibióticos o compuestos contra la LMC.

La técnica de citotoxicidad mediante el reactivo WST-1 (sales de tetrazolium / formazan) permite analizar de una forma directa la viabilidad celular y de una manera indirecta, medir la proliferación celular. Es un ensayo colorimétrico, de cuantificación espectrofotométrica que se basa en la degradación de las sales de tetrazolium WST-1 [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium] a sales de formazán, mediante la acción de las deshidrogenadas mitocondriales, que se producen de forma natural cuando las células son viables. Esta técnica es sensible, rápida y sencilla cuando se compara con otras técnicas de medida de la proliferación celular, incorporación de 3H-Timidina o 5' bromo deoxiuridina (BrdU) en el ADN nuclear u otras técnicas de citotoxicidad como el MTT, y sus variantes el XTT o el MTS (Mosmann, 1983).

En la proliferación celular está implicado el aumento en el número de células con replicación obligatoria del DNA. Se deben utilizar más de una técnica para verificar que dicha proliferación si está ocurriendo, estas técnicas incluyen conteo directo de células, incorporación de sustancias radioactivas y técnicas de citogenética, en esta investigación, se aplicaron las dos primeras unicamente indicando una proliferación celular importante en la K562.

La inmortalización mediante oncogenes permite el cultivo de grandes cantidades de células con propiedades homogéneas y son un excelente modelo para el estudio de su potencial de proliferación o integración después de su aplicación. (Martinez-Serrano y Bjorklund 1997).

El modelo utilizado en este trabajo es la línea celular inmortalizada K562 por su capacidad proliferativa e inductora de la LMC. Representa un buen modelo de investigación *in vitro*.

Estas células han sido utilizadas en numerosos estudios sobre proliferación *in vitro* (Cattaneo et al., 1996; Conti et al., 2001; Weinelt et al., 2003) (Barresi et al., 2003; Benedetti et al., 2000; Corti et al., 1996; Torchiana et al., 1998). En experimentos previos se había observado como la proliferación de K562 inhiben las capacidades citotóxicas y citolíticas así como apoptóticas de CD3(+)CD56(+) directamente desde el estado proliferante a 33°C en las células de sangre periférica de los pacientes con LMC.

La baja concentración celular tanto de CD3(+) y como de CD56(+) no presentó efecto alguno sobre las células K562. Sin embargo, hubo una importante proliferación celular de K562. Esta implica clinicamente que es fundamental que los pacientes tengan un nivel adecuado de las células mononucleares en la sangre para poder inhibir el efecto leucémico de las células K562.

A las 12 horas el crecimiento de K562 es similar tanto el placa de 96 (11.4mm²) como en la de 12(0.3cm²). Las células K562 crecen mucho más rápido en un medio más amplio y adecuado.

La absorbancia de CD3(+) y CD56(+) fueron muy baja por las mismas bajas concentraciones mientras la de K562 fue muy alta permitiendo así su alta proliferación celular. Clinicamente los pacientes de recaída sufren más cuadros severos de LMC en estas condiciones. Cuadro 2.

Las dos células CD3(+) y CD56(+) disminuyen en crecimiento drásticamente en un periodo de una hora. Esto sugiere que el cultivo de cada una necesita más concentración celular y factores de crecimiento. Gráfica 6.

Las células CD3(+)CD56(+) ejercen un efecto citotóxico sobre las células K562, observándose que cuando se incrementa el número de células el efecto citotóxico aumenta en las células K562 hasta llegar a un punto de saturación. La absorbancia es el filtro que permite detectar el cambio colimétrico de la reacción de proliferación celular o apoptosis.

Para desarrollar un procedimiento de proliferación e inhibición *in Vitro* se debía en primer lugar rediseñar las condiciones de cultivo de las células CD3(+)CD56(+) para adaptarlas a los objetivos. Estas necesidades requerían un medio de cultivo donde fuese posible inducir una proliferación completa y funcional a la vez que garantizar una supervivencia celular aceptable. Se quería emplear células con el máximo grado de inhibición pero con buenas expectativas de supervivencia *in vivo*. Con el fin de encontrar un equilibrio entre supervivencia de CD3(+)CD56(+) e inhibición de K562 se ha ensayado toda una serie de estrategias con los cultivos. Se ha comprobado como la muerte inducida de las células K562 por las CD3(+)CD56(+). La potencial de proliferación de K562 depende del factor inhibitorio presente en su molécula. Del mismo modo, la supervivencia celular es también insensible a los factores secretados por las CD3(+)CD56(+).

En la investigación se ha mostrado tras realizar una curva dosis-respuesta que CD3(+)CD56(+) presenta *in vitro* una actividad citostática o de inhibición del crecimiento en un rango de 150 μ L a 300 μ L sobre K562 (Figura 30 y Gráfica 2). Así se evaluó la actividad antitumoral en la línea celular K562. Es importante destacar que este efecto inhibitorio se presenta en las líneas celulares tumorales de diferentes tumores sólidos y de leucemias, no siendo específico de un tejido tumoral.

Se ha conseguido finalmente ese equilibrio con el aumento de las células CD3(+)CD56(+) sobre las K562, concentración de 150 μ L a 300 μ L sobre K562. Si se aumenta el número de células mononucleares, adquieren una inhibición morfológica más evidente, pero su supervivencia es muy pobre. Algunos autores han utilizado de la misma forma medios con concentraciones altas de células contra otras líneas celulares tumorales para producir el efecto inhibitorio sobre la proliferación de esas células (Rubio et al., 1999).

Las células CD3(+)CD56(+) no crece por sí sola, sino que necesita para su crecimiento de 2L-mercaptoetanol, interferon gamma, IL-2 y anticuerpo monoclonal anti CD3 OKT3 para expandirse aun hasta de 21 a 30 días.

Este proceso de proliferación *in vitro* permite, además, la generación de una población homogénea de un solo tipo celular. En la LMC, por ejemplo, se estima que para lograr claros beneficios terapéuticos deberían emplear al menos 100 000 células/ μ L funcionales. Teniendo en cuenta que hay un porcentaje muy bajo de las células mononucleares en PBMNCs (Lindvall et al., 2004), y que la supervivencia de estos mononucleares suele ser menor del 5-10% (Arenas 2002; Brundin et al., 2000), resulta que el número de células totales a emplear debería ser de alrededor de 10-40 millones/ μ L.

Es muy difícil, por lo tanto, llevar a cabo este tipo de empleo a partir de tejido extraído de fetos humanos. En cambio el uso de células madre y su diferenciación mediante protocolos estandarizados permitiría la generación de poblaciones celulares más homogéneas, reduciendo de esta forma el número total de células a emplear. Eficiencias de más del 70% como las obtenidas en la presente investigación para células mononucleares (Wagner et al., 1999a) representan un grado de homogeneidad útil para la realización de terapias celulares.

En la actualidad, hay muchas esperanzas puestas en las células madre. Los pacientes, los medios de comunicación, los políticos, la sociedad en general observan

con detenimiento el avance de la ciencia y la medicina en este campo. ¿Es realmente fundada esta expectación? ¿Es realista esperar que las células madre vayan a ser capaces de curar todas estas enfermedades? En estos momentos tenemos evidencias significativas de que a corto-medio plazo será posible disponer de nuevas terapias celulares para algunas patologías. Sin embargo, para otras enfermedades, las aplicaciones terapéuticas se vislumbran tan sólo a muy largo plazo. En realidad ya hace bastantes años que la medicina está aplicando con éxito terapias celulares basadas en el trasplante de células madre. Es el caso del sistema hematopoyético, donde se conocen muy bien sus células madre y su capacidad de regeneración del sistema sanguíneo, y que se utilizan eficazmente para el tratamiento de enfermedades como las leucemias (Siminovitch et al., 1963; Till y McCulloch 1961). Actualmente también se están iniciando ensayos clínicos para la reparación de cáncer pancreático, cicatrices, fístulas o tejido óseo mediante el implante de células madre o progenitores.

Hoy en día se disponen de suficientes datos científicos sobre el potencial que poseen las células madre y sobre nuestra capacidad de controlar el destino fenotípico de estas células, como los aportados en la presente tesis, para suponer razonablemente que, no muy a largo plazo, podamos generar eficientemente células de un determinado fenotipo para remplazar poblaciones celulares muy específicas. Cuanto más restringida y concreta sea la población de células a reemplazar, tanto por su fenotipo como por su localización y función, más expectativas de éxito tiene una terapia de este tipo. Enfermedades como la diabetes, las cardiomiopatías, o la enfermedad de Parkinson podrían tener pronto nuevos tratamientos basados en terapias celulares. Las terapias de neuroprotección con células como vehículos de administración podrían también ver su aplicación clínica a medio plazo.

Parece prematuro, hablar de terapias celulares basadas en las células madre para enfermedades como la de Alzheimer o los infartos cerebrales. Queda, por lo tanto, mucho camino por recorrer hasta que las investigaciones den sus frutos y se traduzcan en tratamientos reales para los pacientes. No se deben dar falsas expectativas y los avances médicos deben apoyarse en conocimientos científicos sólidos. Tampoco debemos, asimismo, interrumpir ni retrasar las investigaciones. Debe hacerse un análisis en paralelo a estas investigaciones en cuanto a las implicaciones éticas de sus métodos o resultados, basándose en datos científicos y en el sentido común más humanista posible. La investigación básica y biomédica sobre las células madre y sus aplicaciones está aún en los inicios de lo que promete ser una aventura larga y difícil, pero enormemente emocionante.

En México, aunque es muy difícil predecir qué pasará en los próximos años con el diagnóstico y manejo de esta patología en nuestro país, es muy probable que se llegue a introducir a corto plazo las técnicas de biología molecular y de hibridización *in situ*, con las cuales se individualizarán los tipos de leucemia y los riesgos de recaída para cada paciente. También es posible que lleguen a utilizarse fármacos complejos que incluyan anticuerpos específicos o que hayan sido producidos mediante tecnología recombinante.

También el mejor uso de la TC con métodos novedosos, hará más fácil el tratamiento de algunos casos con este problema. Todo esto, aunado a los modernos métodos diagnósticos que de seguro aparecerán en los años venideros, hará que se planifique un tratamiento personalizado para cada paciente, tomándose en cuenta los factores pronósticos y el tipo de leucemia que presente.

5.- CONCLUSIONES

- 1.- La baja concentración celular de CD3(+) y CD56(+) no induce efecto citotóxico y citolítico en las K562 y por lo tanto hay más proliferación celular.
- 2.- El aumento de número de células de CD3(+) y CD56(+) de 150 a 300 μ L induce un efecto apoptótico importante en las células K562 y sobre todo más con 300 μ L que con 150 μ L.
- 3.- Se produce fragmentación del DNA de las células K562 al sufrir una apoptosis importante.
- 4.- Las células K562 crecen mucho más rápido en un medio más amplio y adecuado.
- 5.- El crecimiento celular de CD3(+) y CD56(+) disminuye drásticamente en un periodo de una hora. Esto se debe a que hay baja concentración y posiblemente la falta de algún factor de crecimiento celular.
- 6.- Clínicamente es importante que los pacientes tengan números suficientes de células mononucleares (CD3+CD56+) para poder combatir la LMC.
- 7.- La TC podrá ser la mejor alternativa para el tratamiento de LMC en un futuro no muy lejano.
- 8.- Será importante investigar como expandir mejor in vitro las células CD3(+) y CD56(+).

BIBLIOGRAFIA

- Abbas AK y Lichtman, (2003). Cellular and Molecular Immunology (5th ed.), Editor: WB Saunders, Philadelphia.
- Abuja H, Bar-Eli M, Arlin Z, *et al.* (1991). The spectrum of molecular alterations in the evolution of chronic myeloid leukemia. *J Clin Invest*, 87, 2042-2046.
- Aiuti A, Slavin S, Aker M, Ficara F, Deola S, Mortellaro A, *et al.* (2002). Correction of ADA-SCID by stem cell gene therapy combined with nonmyeloablative conditioning. *Science*; 296:2410-2413
- Alberts *et al.*, (2002). "Molecular Biology of the Cell" (4^a ed.), Garland Publishing, New York.
- Alberts *et al.*, (2004). "Biología Molecular de la célula" (4^a ed.), Ed. Omega, Barcelona.
- Alberts, Bruce; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. (2002). "Molecular Biology of the Cell" 4a ed. Garland Science.
- Allan NC, Richards SM, Shepherd PCA. (1995). UK Medical Research Council randomized multicentre trial of interferon- α 1 for chronic myeloid leukaemia: improved survival irrespective of cytogenetic response. *Lancet*, 345, 1392-1397.
- Alvarez-Dolado M., Pardal R., Garcia-Verdugo J. M., Fike J. R., Lee H. O., Pfeffer K., Lois C., Morrison S. J., and Alvarez-Buylla A. (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 425, 968-973.
- Ameisen JC. (1992). Programmed cell death and AIDS: From hypothesis to experiment. *Immunol Today*;13:388.
- Andersson, L.C.; Nilsson, K.; Gahmberg, C.G. (1979), "K562 - A human erythroleukemic cell line", *International Journal of Cancer* 23 (2): 143-147.
- Arai S, Klingemann HG (2003). Hematopoietic stem cell transplantation: bone marrow vs. mobilized peripheral blood. *Arch Med Res*; 34:545-553.
- Ardashnikov, S.N. (1937). The genetics of leukemia in man. *J. Hyg.* 37:286-302.
- Arenas E. (2002) Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 57, 795- 808.

- Aur, R.A.J., J.V. Simone, H.O. Hustu, T. Walters, L. Borella, C. Pratt & D. Pinkel. (1971). Central nervous system therapy and combination chemotherapy of childhood lymphocytic leukemia. *Blood* 37: 272-281.
- Aurich J, Duchayne E, Huguest- Rigal F, Navaro M, Perel Y, Paris J, Caballó MR, Dastugue N. (1998). Clinical, morphological, cytogenic and molecular aspects of a series of Ph-negative chronic myeloid leukemia. *Hematol Cell Ther*; 40;149-158.
- Aversa F, Tabilio A, Velardi A, Cunningham I, Terenzi A, Falzetti F, et al. (1998). Tratamiento de alto riesgo con leucemia aguda de células T con depleción de células madre a partir de donantes relacionados con un coincide plenamente haplotipo HLA. *N Engl J Med*; 339:1186-93.
- Avots A, Harder F, Schmittwolf C, Petrovic S, Muller AM. (2002). Plasticity of hematopoietic stem cells and cellular memory. *Immunol Rev. Sep*; 187:9-21.
- Bain G., Ray W. J., Yao M., and Gottlieb D. I. (1996) Retinoic acid promotes neural and represses mesodermal gene expression in mouse embryonic stem cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 223, 691-694.
- Barnes, D. y Sato, G. (1980). "Methods for growth of cultured cells in serum free-medium". *Anal. Biochem.* 102 : 255-270.
- Barker JN, Wagner JE. (2003). Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nature*; 3:526-532.
- Baron F, Storb R, (2003). Little MT. Hematopoietic cell transplantation: five decades of progress. *Arch Med Res*; 34:528-544.
- Barral A.M., Fernández A., Faxas M.E., Pérez X., García C.A. & Rosén A. (1997) Cell-cell adherence as a selection method for the generation of anti-melanoma monoclonal antibodies. *Journal of Immunological Methods* 203(1), 103-109.
- Barresi V., Belluardo N., Sipione S., Mudo G., Cattaneo E., and Condorelli D. F. (2003) Transplantation of prodrug-converting neural progenitor cells for brain tumor therapy. *Cancer Gene Ther* 10, 396-402.
- Barrett AJ, Childs R. (2000). Non-myeloablative stem cell transplants. *Brit J Haematol*, 111, 6-17.
- Barrett AJ, Malkovska V. (1996). Graft-versus-leukaemia: understanding and using the allo-immune response to treat haematological malignancies. *Brit J Haematol*, 93, 754-761.
- Barth, C. (1856). Altération du sang remarquable par la prédominance des globules blancs ou musqueux ; hypertrophie considérable de la rate. *Bull. Soc. Méd. Hôp., Paris.* 39 p

- Barton CH, Dickson G, Gower, HJ, Rowett LH, Putt W, Elsom V, Moore SE, Goridis C, Walsh FS (1988). Secuencia completa y en la expresión in vitro de un tejido-fosfatidilinositol específica ligada N-CAM isoforma de músculo esquelético. *De Desarrollo*, 104:165 [PubMed](#)
- Baruchel, A., T. Leblanc & G. Schaison. (1999). Pathology of acute lymphoblastic leukemia. *In* J. Lilleyman, I. Hann & V. Blanchette (eds.). *Pediatric Hematology*. Churchill Livingstone, London, England. 520 p.
- Benedetti S., Pirola B., Pollo B., Magrassi L., Bruzzone M. G., Rigamonti D., Galli R., Selleri S., Di Meco F., De Fraja C., Vescovi A., Cattaneo E., and Finocchiaro G. (2000) Gene therapy of experimental brain tumors using neural progenitor cells. *Nat Med* 6, 447-450.
- Benito Al, Diaz MA, González- Vicent M, Sevilla J, Madero L. (2004). Hematopoietic stem cell transplantation using umbilical cord blood progenitors: review of current clinical results. *Bone Marrow Transp*; 33:675-690.
- Bennett, J.H. (1845). Case of hypertrophy of spleen and liver in which death took place from suppuration of blood. *Edinburgh Med. Surg. J.* 64: 413-423.
- Bennett, J.H. (1852). Leucocythaemia or white cell blood. Sutherland and Knox, Edinburgh.
- Bennet, J.M., D. Catowsky, M.T. Daniel, G. Flandrin, D.A.G. Galton, H.R. Gralnick y C. Sultan. (1985). Proposed revised criteria for the classification of acute Mieloid Leukemia. A report of the French- American-British co-operative group. *Ann. Int. Med.* 100: 626-629.
- Binder C, Marx D, Overhoff R, Binder L, Schauer A, Hiddemann W. (1995). Bcl-2 protein expression in breast cancer in relation to established prognostic factors and other clinicopathogenical variables. *Annals of Oncology*; 6:1005-10.
- Birch, J.R. y Pirch, S.J. (1971). "Improvements in a chemically defined medium for the growth of mouse cells (strain LS) in suspension". *J. Cell. Sci.* 7 : 661-670.
- Bjorklund A. and Lindvall O. (2000). Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 3, 537-544
- 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., and Isacson O. (2002). Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinson rat model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2344-2349.
- Bjornson C. R., Rietze R. L., Reynolds B. A., Magli M. C., and Vescovi A. L. (1999) Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283, 534-537.

- Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. (2001). The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*; 105:829-841.
- Boise LH, González-Garcia M, Postema CE. (1993). Bcl-X and Bcl-2 related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*;74:597-08.
- Boise LH, Winn AJ, Thompson CB. (1995). Receptors that regulate T-Cell susceptibility to apoptotic cell death. *Ann N Y Acad Sci*;766:70-80.
- Boise LH, Gottschalk AR, Quintns J, Thompson CB. (1995). Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation. *Curr Top Microbiol Immunol*; 200:107-21.
- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. (2002). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*; 290:1775-1779
- Brewster, H.F. & H.E. Cannon. (1930). Acute lymphatic leukemia: report of a case in an eleventh month Mongolian idiot. *New Orleans Med. Surg. J.* 82: 872-873.
- Britten, C.M.; Meyer, R.G.; Kreer, T.; Drexler, I.; Wölfel, T.; Herr, W. (2002), "The use of HLA-A 0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays", *Journal of Immunological Methods* 259 (1-2): 95-110
- Brundin P., Karlsson J., Emgard M., Schierle G. S., Hansson O., Petersen A., and Castilho R. F. (2000) Improving the survival of grafted dopaminergic cells: a review over current approaches. *Cell Transplant* 9, 179-195.
- Brümmendorf TH, Holyoake TL, Rufer N, *et al.* (2000). Prognostic implications of differences in telomere length between normal and malignant cells from patients with chronic myeloid leukemia measured by flow cytometry. *Blood*, 95, 1883-1890.
- Brunning. R. D. 1984. Chronic myelogenous leukemia. In *Laboratory Hematology*, Churchill Livingstone Inc. London; 1; 289-323.
- Brustle O, Jones KN, Learish RD, Karram K, Choudhary K, Wiestler OD, Duncan ID, McKay RD. (1999). Related Articles Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science*. Jul 30;285(5428):7546.
- Burger, S. R., M. M. Zutter, S. Sturgill-Koszycki, and S. A. Santoro. (1992). Induced cell surface expression of functional $\alpha 2 \beta 1$ integrin during mega-karyocytic differentiation of K562 leukemic cells. *Exp. Cell Res.* 202:28–35.
- Burgio GR, Gluckman E, Locatelli F. (2003). Ethical reappraisal of 15 years of cord-blood transplantation. *Lancet*; 361:250-252.
- Campion, E.W. (1997). Power lines, cancer and fear. *N. Engl. J. Med.* 337: 44-46.
- Caputo, J.L. (1996) Safety Procedures. In Freshney, R.I., Freshney, M.G., eds., *Culture of Immortalized Cells*. New York, Wiley-Liss, pp. 25–51.

- Carella AM, Cunningham I, Lerma E, *et al.* (1997). Mobilization and transplantation of Philadelphia-negative peripheral blood progenitor cells early in chronic myelogenous leukemia. *J Clin Oncol*, 15, 1575-1582.
- Carella AM, Lerma E, Corsetti MT, Dejana A, Celesti L, Casarino L, *et al.* (1998). Pruebas de citogenética molecular y la remisión por alogénico de células después de la terapia inmunosupresora por sí solo. *Br J Haematol*; 103:565-7.
- Cascino I, Papoff G, De Maria R, Testi R, Ruberti G. (1994). Fas/Apo-1(CD95) receptor lacking the intracytoplasmatic signaling domain protects tumor cells from Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.*; 156(1):13-17.
- Cassileth B. (1998). *La medicina alternativa manual*. Nueva York, NY: WW Norton & Co.
- Cattaneo E., De Fraja C., Conti L., Reinach B., Bolis L., Govoni S., and Liboi E. (1996) Activation of the JAK/STAT pathway leads to proliferation of ST14A central nervous system progenitor cells. *J Biol Chem* **271**, 23374-23379.
- Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey-Abina S, de Saint BG, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, *et al.* (2000). Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*; 288:669-672.
- Celis JE (1998). *Cell Biology. A Laboratory Handbook*. Harcourt Publishers Ltd, UK.
- Cervantes F, Miller JS, McGlave PB. (1995). Cytolytic activity by lymphokines (LAK activity) in chronic myeloid leukemia. *Med Clin (Barc)*. Jun 10;105(2):50-3.
- Cervantes F, Pierson BA, McGlave PB, Verfaillie CM, Miller JS. (1996). Autologous activated natural killer cells suppress primitive chronic myelogenous leukemia progenitors in long-term culture. *Blood*. Mar 15;87(6):2476-85
- Champlin R, Khouri I, Shimoni A, *et al.* (2000). Harnessing graft-versus malignancy: non-myeloablative preparative regimens for allogeneic haematopoietic transplantation, a evolving strategy for adoptive immunotherapy. *Brit J Haematol*, 111, 18-29
- Chao NJ, Emerson SG, Weinberg KI. (2004). Stem cell transplantation (cord blood transplants). *Hematology*; 1:354-371.
- Chen, T.R. (1977) In situ detection of mycoplasma contamination in cell cultures by fluorescent Hoechst 33258 stain. *Exp. Cell Res.* 104: 255.
- Chen YH, Chen HY, Hsu CL, Yen GC. (2007). In vitro effects of native human acute myelogenous leukemia blasts on fibroblasts and osteoblasts. *J Agric Food Chem*. Mar 7;55(5):1743- 9. Epub 2007 Feb 13
- Churchill, A.E. & P.M. Biggs. (1967). Agent of Marek's disease in tissue culture. *Nature* 215: 528-530.

- Clark, R.E.; Dodi, I.A.; Hill, S.C.; Lill, J.R.; Aubert, G.; Macintyre, A.R.; Rojas, J.; Bourdon, A. *et al.* (2001), "Direct evidence that leukemic cells present HLA-associated immunogenic peptides derived from the BCR-ABL b3a2 fusion protein", *Blood* 98 (10): 2887-2893.
- Clarke D. L., Johansson C. B., Wilbertz J., Veress B., Nilsson E., Karlstrom H., Lendahl U., and Frisen J. (2000) Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288, 1660-1663.
- Clancy C. Lawrence N. (2002). Is outcomes research on cancer ready for prime time. *Med Care*; 40 (Supl): 92-100.
- Clemmensen, J. (1974). On the epidemiology of leukemia, pp. 1-50. *In* F.J. Cleton, D. Crowther & J.S. Malpas (eds.). *Advances in acute leukemia*. North Holland, Elsevier.
- Clement MV, Stamenkovic I. (1994). Fas and Tumor Necrosis Factor Receptor-mediated cell death: Similarities and distinctions. *J Exp Med*;180:557-67.
- Cohen JJ. (1993). Apoptosis. *Immunol. Today*;14(3):126-30.
- Cohen Y, Nagier A. (2004). Cord blood biology and transplantation. *IMAJ*; 6:39-46.
- Conti L., Sipione S., Magrassi L., Bonfanti L., Rigamonti D., Pettrossi V., Peschanski M., Haddad B., Pelicci P., Milanese G., Pelicci G., and Cattaneo E. (2001) Shc signaling in differentiating neural progenitor cells. *Nat Neurosci* 4, 579-586.
- Cooper, Geoffrey M. Cooper (2000). "The Cell a Molecular Approach" 2a ed, Sinauer.
- Corti O., Horellou P., Colin P., Cattaneo E., and Mallet J. (1996) Intracerebral tetracyclinedependent regulation of gene expression in grafts of neural precursors. *Neuroreport* 7, 1655-1659.
- Cory S. (1995). Regulation of lymphocyte survival by the Bcl-2 gene family. *Ann Rev, Immunol*;13:513-43.
- Cowan CA, Klimanskaya I, McMahon J, Atienza J, Witmyer J, Zucker JP, et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* 2004; 350:1353-1356.
- Craddock C, Szydlo RM, Dazzi F, *et al.* (2001). CMV serostatus is a major determinant of outcome after T-depleted unrelated donor transplant in patients with chronic myeloid leukaemia: the case for tailored GVHD prophylaxis. *Br J Haematol*, 112, 228-236
- Craigie, D. (1845). Case of disease of spleen in which death took place in consequence of the presence of purulent matter in the blood. *Edinburgh Med. Surg. J.* 400-413.

- Cremer H, Lange R, Christoph A, Plomann M, Vopper G, Roes J, Brown R, Baldwin S, P, Kraemer, Scheff S. (1994). La inactivación del gen N-CAM en ratones resulta en la reducción de tamaño del bulbo olfatorio y el déficit en el aprendizaje espacial. *Nature* 367:455 [PubMed](#)
- Cunningham BA, Hemperly JJ, Murray BA, Prediger EA, Brackenbury R, Edelman GM (1987). Molécula de adhesión celular neuronal: la estructura, como los dominios de las inmunoglobulinas, la modulación de la superficie celular, y el ensamblaje del ARN alternativa. *Science*, 236:799 [PubMed](#)
- Dani C, Chambers I, Johnstone S, Robertson M, Ebrahimi B, Saito M, Taga T, Li M, Burdon T, Nichols J, Smith A. (1998). Paracrine induction of stem cell renewal by LIF deficient cells: a new ES cell regulatory pathway. *Dev Biol.* Nov 1;203(1):149-62.
- Daniel Weiss, Mary Anne Berberich, Zea Borok, Dorothy Gail, Jay Kolls, Christopher Penland y Darwin Prockop. (2006). Adult Stem Cells, Lung Biology, and Lung Disease (Células madre adulto, biología pulmonar y enfermedad pulmonar); Proceedings of the American Thoracic Society, volumen 3 193-207
- Daley G. (2002). Prospects for stem cell therapeutics: myths and medicines. *Curr Opin Genet Dev.* Oct;12(5):607.
- Daley GQ, Goodell MA, Snyder EY. (2003). Realistic prospect for stem cell therapeutics. *Hematology*; 1:398-418.
- Dameshek, W. & F. Gunz. (1964). *Leukemia*. 1 p. Grune & Stratton, New York/London.
- Dante R. Chialvo. (2002). Physiology: Unhealthy surprises *Nature* 419, 263
- Darnell, James E. (2000). "Molecular Cell Biology", WH Freeman and Company.
- Davey S, Armitage S, Rocha V, Garnier F, Brown J, Brown CJ, et al. (2004). The London Cord Blood Bank: analysis of banking and transplantation outcome. *Br J Haematol*; 125:358-365
- Dazzi F, Szydlo R, Cross NCP, et al. (2000). Durability of responses following donor lymphocyte infusions for patients who relapse after allografting for chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96, 2712-2716.
- Dazzi F, Szydlo R, Craddock C, et al. (2000). Comparison of single dose and escalating dose regimens of donor lymphocyte infusions for relapse after allografting for chronic myeloid leukemia. *Blood*, 95, 65-71.
- Deininger MWN, Goldman JM, Melo JV. (2000). The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 96, 3343-3356.

- De Klein, A., A.G. Van Kessel, G. Grosveld, C.R. Bartram, A. Hagemeijer, D. Bootsma, N.K. Spurr, N. Heisterkamp, J. Groffen & J.R. Stephenson. (1982). A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukemia. *Nature*. 300: 765-767.
- De Vries JF, Falkenburg JH, Willemze R, Barge RM. (2006). The mechanisms of Ara-C induced apoptosis of resting B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Haematologica*. Jul;91(7):912-9. Comment in: *Haematologica*. 2006 Jul;91(7):868.
- Dinsmore J., Ratliff J., Deacon T., Pakzaban P., Jacoby D., Galpern W., and Isacson O (1996). Embryonic stem cells differentiated in vitro as a novel source of cells for transplantation. *Cell Transplant* 5, 131-143.
- Donovan P. J. and Gearhart J. (2001) The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 414, 92-97.
- Donné, A. (1844). Cours de microscopie. J.B. Baillière, Paris. 132 p.
- Doyle A, J.B. Griffiths, D.G. (1996). Newell. Cell and tissue culture: laboratory procedures. John Wiley and Sons, cop. Chichester.
- Douglas, W.H.J., McAteer, J.A., Dell'Orco, R.T. y Phelps, D. (1980). "Visualization of cellular aggregates cultured on a three dimensional collagen sponge matrix". In *Vitro* 12 :306-312.
- Draper J. S., Smith K., Gokhale P., Moore H. D., Maltby E., Johnson J., Meisner L., Zwaka P., Thomson J. A., and Andrews P. W. (2004) Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 22, 53-54.
- Drexler, H.G. (2000), *The Leukemia-Lymphoma Cell Line Factsbook*, San Diego: Academic Press.
- Eagle, H. (1959). "Amino acid metabolism in mammalian cell cultures". *Science* 130:432
- Earle, W.R., Evans, V.J., Bryant, J.C., Fioramonti, M.C., McQuilkin, W.T., Sanford, K.K., y (1956), "Studies of nutrient media for tissue C cells in vitro. I A protein-free chemically defined medium for cultivation of strain L cells". *Cancer REs*. 16 : 77
- Ehrlich, P. (1891). In A. Hirschwald (ed.). *Farbenanalytische Untersuchungen zur Histologie und Klinik des Blutes*. Berlin, A. Hirschwald. 137 p.
- Eisinger, M., Lee, J.S., Hefton, J.M., Darzykiewicz, A., Chiao, J.W., Deharven, E. (1979). "Human epidermal cell cultures - growth and differentiation in the absence of dermal components or medium supplements". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 : 5340

- Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol*;7:663.
- Elmaagacli AH, Beelen DW, Opalka B, *et al.* (1999). The risk of residual molecular and cytogenetic disease in patients with Philadelphia chromosome positive chronic phase myelogenous leukemia is reduced after transplantation of allogeneic peripheral blood stem cells. *Blood*, 94, 384-389.
- Epstein, M.A., B.G. Achong & Y.M. Barr. (1964). Virus particles in cultured lymphoblasts from Burkitt's lymphoma. *Lancet*. 1: 702-703.
- Ersvaer E, Hampson P, Wendelbo Ø, Lord JM, Gjertsen BT, Bruserud Ø. (2007). Circulating T cells in patients with untreated acute myelogenous leukemia are heterogeneous and can be activated through the CD3/TCR complex. *Hematology*. Jun;12(3):199-207.
- Ersvaer E, Skavland J, Ulvestad E, Gjertsen BT, Bruserud Ø. (2007). Effects of interferon gamma on native human acute myelogenous leukaemia cells. *Cancer Immunol. Immunother.* Jan;56(1):13-24. Epub 2006 Apr 13.
- Ersvaer E, Zhang JY, McCormack E, Olsnes A, Anensen N, M Tan E, Gjertsen BT, Bruserud O. (2007). Cyclin B1 is commonly expressed in the cytoplasm of primary human acute myelogenous leukemia cells and serves as a leukemia-associated antigen associated with autoantibody response in a subset of patients. *Eur J Haematol*. Sep;79 (3):210-25. Epub 2007 Jul 26.
- Evans, V.J. y Briant, J.C. (1965). "Advances in tissue culture at the National Cancer Institute in the United States of America". En "Tissue culture", edit. por C.V. Ramakrishnan (ed.). W. Junk. The Hague. pp. 145-167.
- Evans MJ, y Kaufman MH. (1981). Establishment in culture of pluripotential stem from mouse embryos. *Nature*; 292:154-156.
- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, *et al.* (1999a). The biology of chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med* 341, 164-172
- Faderl S, Talpaz M, Estrov Z, O'Brien S, Kurzrock R, Kantarjian HM. (1999b) The biology of chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*; 341:164-72
- Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, *et al.* (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*; 279:1528-1530.
- Ferrari G, Mavilio F. (2000). Myogenic stem cells from the bone marrow: a therapeutic alternative for muscular dystrophy? *Neuromuscul Disord* 2002; 12 (S1):7-10.
- Fialkow PJ. (1981) Evidence for a multistep origin of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 58, 158-163.

- Ford, A.M., S.A. Ridge, M.E. Cabrera, H. Mahmoud, C.M. Steel, L.C. Chan & M. Greaves. (1993). In utero rearrangements in the trithorax-related oncogene in infant leukaemias. *Nature* 363: 358-360.
- Frederiksen K., Jat P. S., Valtz N., Levy D., and McKay R. (1988) Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron* 1, 439-448.
- Freshney, R.I. (2002) Cell line provenance. *Cytotechnology* 39: 3–15.
- Freshney, R.I. (2005) *Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 5th Ed. Hoboken NJ, John Wiley & Sons
- Freshney RI (2005). Culture of Animal Cells. A manual of basic technique. Fifth Edition. Wiley-Liss Corp, New York.
- Friedreich, N. (1857). Ein neuer Fall von Leukämie. *Virchow's Arch. Pathol. Anat.* 12: 37-58.
- Fuchs E, Segre JA. (2000). Stem cells: a new lease on life. *Cell*. Jan 7;100(1):143 55.
- Gage FH. (1998). De terapia celular. *Naturaleza*. , 392:18-24.
- Gage F. H. (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438.
- Ganz P, (2002). What outcomes matter to patients. *Med. Care*; 40(Supl): 11-19
- Garrido Colino C. (2003). Estado actual de la investigación con células madre. *An Pediatr (Barc)*; 59:552-558.
- Gao L, Bellantuono I, Elsser A, *et al.* (2000). Selective elimination of leukemic CD34+ progenitor cells by cytotoxic T lymphocytes specific for WTI. *Blood*, 95, 2198-2203.
- Gao X, Zhang G, Zhou M, Luo D, Li B. (2004). Antiproliferative activity of Goldfussia psilostachys ethanolic extract on K562 leukemia cells. *Fitoterapia*; 75 (7-8): 639-644.
- Gardner RL, Brook FA. (1997). Reflections on the biology of embryonic stem (ES) cells. *Int J Dev Biol.* Apr;41(2):235-43
- Gerritsen EJA, Vossen JM, Fasth A, Friedrich W, Morgan G, Porras O. (1994). Bone marrow transplantation for autosomal recessive osteopetrosis. A report from the Working Party on Inborn Errors of the European Bone Marrow Transplantation Group. *J Pediatr*; 125:896-902.
- Gilbert, Scott F. (2003). "Developmental Biology" 7a ed. Sinauer,
- Gluckman E, Rocha V, Chastang C, (1998). Eurocord-Cord Blood Transplant Group. Cord blood hematopoietic stem cells biology and transplantation. *Hematology*; 1:1-14.

- Gluckman E. (2004). Ex vivo expansion of cord blood cells. *Exp Hematol*; 32:410-412.
- Gluckman E, (2000). Eurocord Netcord Organization. Ethical and legal aspects of placental/cord blood banking and transplant. *Hematol J*; 1:67-69.
- Goldman JM, Apperley JF, Jones LM, *et al.* (1986). Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 314, 202-207.
- Gonindard C., Bergonzi C., Denier C., Sergheraert C., Klæbe A., Chavant L. & Hollande E. (1997) Synthetic hispidin, a PKC inhibitor, is more cytotoxic toward cancer cells than normal cells in vitro. *Cell Biology and Toxicology* 13, 141-153.
- Gratwohl A, Hermans J, Niederwieser D, *et al.* (1993). Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: long-term results. *Bone Marrow Transplant*, 12, 509-516.
- Gratwohl A, Hermans J, Goldman J, *et al.* (1988) Risk assessment for patients with chronic myeloid leukaemia before allogeneic blood or marrow transplantation. *Lancet*, 352, 1078-1092.
- Greco, B., Recht, L. (2003) Somatic plasticity of neural stem cells: Fact or fancy? *J. Cell. Biochem.* 88: 51–56.
- Greer, J: Wintrone's (2004). Clinical Hematology. 2 Vols Lippincot, 1600 páginas.
- Gretchen Vogel (2005). Korean Team Speeds Up Creation Of Cloned Human Stem Cells *Science*, Vol 308, Issue 5725, 1096-1097
- Gross, L. (1951). "Spontaneous" leukemia developing in C3H mice following inoculation, in infancy, with AK leukemic extracts or AK embryos. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 76: 27-32.
- Groffen J, Heisterkamp N. (1997). The chimeric BCR-ABL gene. *Bailliere's Clin Haematol*, 10, 187
- Guarente, L. & Kenyon, C. (2000). Genetic pathways that regulate ageing in model organisms. *Nature* 408, 255-262.
- Gurdon JB, Byrne JA, Simonsson S. (2003). Nuclear reprogramming and stem cell creation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100:11819-11822.
- Gutiérrez, H. P. (1998). Control Estadístico de Calidad y seis sigma, Roman de la Vara Salazar. Mc. Graw Hill.
- Gupta, V., Tabak, D., Keating, A: (2002). Acute Promyelocytic Leukemia: a Case based Review. *Hematology*, , 8(2): 105-113.
- Hacein-Bey-Abina S, Le Deist F, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, de Villartay JP, *et al.* (2002). Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Engl J Med*; 346: 1185-1193.

- Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, et al. (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*; 348: 255-256.
- Hacein-Bey-Abina S, Von Kalle C, Schmidt M, McCormack MP, Wulffraat N, Leboulch P, et al. (2003). LM02-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*; 302:415-419.
- Ham, R.G. (1965). "Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined synthetic medium". *Proc. Natl. Sci. USA* 53 : 288.
- Ham, R.G. y McKeehan, W.L. (1978). "Development of improved media and culture conditions for clonal growth of normal diploid cells". *In vitro* 14 : 11-22.
- Hansen JA, Gooley TA, Martin PJ, et al. (1998). Bone marrow transplantation from unrelated donors for patients with chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, 338, 962-968.
- Harris ,Henry. (1999). *The Birth of the Cell*. Yale University Press. New Haven and London.
- Hart DNJ . (1997). Células dendríticas: las poblaciones de leucocitos únicas que controlan la respuesta inmune primaria. *Sangre*; 90:3245-87.
- Hansmann ML, Collins G, Robertson H, Natkunam Y, Pileri S, Campo E, Clark EA, Mason DY, Marafioti T. (2006). The differential expression of LCK and BAFF-receptor and their role in apoptosis in human lymphomas. *Haematologica*. 2006 Jun;91(6):772-80. Comment in: *Haematologica*. Jun;91(6):725A.
- Hasford J, Pfirrmann M, Hehlmann R, et al. (1998). A new prognostic score for survival of patients with chronic myeloid leukemia treated with interferon alfa. *J Natl Cancer Inst*, 90, 850-858.
- Hay, R.J., Miranda-Cleland, M., Durkin, S., Reid, Y.A. (2000) Cell line preservation and authentication. In Masters, J.R.W, ed., *Animal Cell Culture*, 3rd Ed. Oxford, Oxford University Press, pp. 69–103
- Hehlmann R, Hochhaus A, Kolb H-J, et al. (1999). Interferon- α before allogeneic bone marrow transplantation in chronic myelogenous leukemia does not affect outcome adversely, provided it is discontinued at least 90 days before the procedure. *Blood*, 94, 3669-3677.
- Heim S, Mitelman F. (1995). *Cancer cytogenetics*. 2a ed. New York: Wiley-Liss;. pp. 23-28
- Hemperly JJ, DeGuglielmo JK, Reid RA (1990). Caracterización de clones de ADNc de definir las formas de la variante humana molécula de adhesión celular neuronal N-CAM. *J Mol Neurosci*. 2:71 [PubMed](#)

- Hercend T, Griffin JD, BENSUSSAN A, Schmidt RE, Edson MA, Brennan A, Murray C, Daley JF, Schlossman SF, Ritz J (1985). Generación de anticuerpos monoclonales para clonar un ser humano "asesinas" naturales. Caracterización de dos asesinas naturales antígenos asociados, NKH1A y NKH2, expresada en subconjuntos de linfocitos grandes granulares. *J Clin Invest* 75:932 PubMed.
- Hochedlinger K, Jaenisch R. (2003). Nuclear transplantation, embryonic stem cells, and the potential for cell therapy. *N Engl J Med*; 349:275-286.
- Holyoake T, Jiang Xiaoyan, Eaves C, Eaves A. (1999). Isolation of a highly quiescent subpopulation of primitive leukemic cells in chronic myeloid leukemia. *Blood*, 94, 2056-2064.
- Hongeng S, Petvises S, Worapongpaiboon S, Rerkamnuaychoke B, Pakakasama S, Jootar S. (2003). Generation of CD3+ CD56+ cytokine-induced killer cells and their cytotoxicity against pediatric cancer cells. *Int J Hematol*. Feb;77(2):175-9.
- Horiike, T., Hamada, K., Kanaya, S., & Shinozawa, T., (2001). Célula de naturaleza Biol. 3, 210-214.
- Horowitz MM. (2000). Related donor transplants for chronic myelogenous leukemia. In *Proceedings of the ESH Chronic Myeloid Leukaemia Symposium*. Italy, Rapallo, September.
- Horowitz MM, Giralt S, Szydlo R, *et al.* (1996). Effect of prior interferon therapy on outcome of HLA-identical sibling bone marrow transplants for chronic myelogenous leukemia (CM L) in first chronic phase. *Exper Hematol*, 24, 1143.
- Horwitz EM. (2003). Stem cell plasticity: the growing potential of cellular therapy. *Arch Med Res*; 34:600-606.
- Hoyle C, Bangs CD, Chang P, Kamel O, Mehta B, Negrin RS. (1998). Expansion of Philadelphia chromosome-negative CD3(+)CD56(+) cytotoxic cells from chronic myeloid leukemia patients: in vitro and in vivo efficacy in severe combined immunodeficiency disease mice. *Blood*. Nov 1;92(9):3318-27.
- Hwang WS, Ryu YJ, Park JH, Park ES, Lee EG, Koo JM, *et al.* (2004). Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science*; 303:1669-1674.
- Itoh N, Yonehara S, Ishii A. (1991). The polypeptide encoded by the cDNA for humancell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell*; 6:233-43.
- Iwana H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, *et al.* (1997). The relationship between telomere length and therapy-associated cytogenetic responses in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer*, 79, 1552.
- Jain M, Pfister O, Hajjar RJ, Liao R. Mesenchymal stem cells in the infarcted heart. *Coron Artery Dis* 2005; 16:93-97.

- Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L., Schwartz R. E., Keene C. D., Ortiz-Gonzalez X. R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W. C., Largaespada D. A., and Verfaillie C. M. (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.
- Jo JY, de Mejia EG, Lila MA. (2006). The prognostic role of CXCR3 expression by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Food Chem Toxicol.* 2006 Oct;44(10):1758-67. Epub Jun 3.
- Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. (2002). Cytogenetic and molecular genetic evolution of Philadelphia-chromosome-positive chronic myeloid leukemia. En: Bain BJ, editor. *Chronic myeloproliferative disorders*. Basel, Switzerland: Karger;2003. pp. 44-61. Article based on a article first published in *Acta Haematolog*; 107:76-94.
- Jondal M; Xue Y, McConkey DJ, Okret S. (1995). Thymocyte apoptosis by glucocorticoids and cAMP. *Curr Top Microbiol Immunol*;200:67-79.
- Jordan CT, Guzman ML, Noble M. (2006). Cancer stem cells. *N Engl J Med*; 355(12):1253-1261.
- Juliano, R.L. (2002) Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 42: 283–323
- Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Depraetere V. (1994). Fas and perforina pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science*; 265:528-30.
- Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Lee J., Yoshimoto M., Ogonuki N., Miki H., Baba S., Kato T., Kazuki Y., Toyokuni S., Toyoshima M., Niwa O., Oshimura M., Heike T., Nakahata T., Ishino F., Ogura A., and Shinohara T. (2004). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 685-693.
- Karmiol, S. (2000) Development of serum-free media. In Masters, J.R.W, ed., *Animal Cell Culture*, 3rd Ed. Oxford, Oxford University Press, pp. 105–121.
- Kaufman PB and Wu W (1995). *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Kawakami, T.G., S.D. Huff & P.M. Buckley, D.L. Dungworth, S.P. Synder, R.V. Gilden. (1972). C-type virus associated with gibbon lymphosarcoma. *Nature (New Biol)* 235: 170-171.
- Kawano Y , Takaue Y, Watanabe A, Takeda O, Arai K, Itoh E, et al. (1998). Parcialmente coincidentes con los trasplantes de pediátrica alogénico CD34 + células de la sangre de un donante relacionadas. *Sangre*; 92:3123-30.

- Keller GM. (1995). In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol.* Dec; 7(6):862-9.
- Kh Haider H, Ashraf M. (2005). Bone marrow stem cells in the infarcted heart. *Coron Artery Dis*; 16:99-103.
- Khoury SI , Keating M, Korbaling M, Przepiorka D, Anderlini P, O'Brien S, *et al.* (1998). Transplante-Lite: la inducción de injerto-versus-malignidad utilizando fludarabina nonablative basado en la quimioterapia y la sangre alogénico de células progenitoras de trasplante para el tratamiento de neoplasias linfoides . *J Clin Oncol*; 16:2817-24.
- Kindt, T, *et al.*, (2008). Générale Immunologie, le cours de Janis Kuby avec preguntas de revisión de, 6ème édition, Paris, Editions Dunod.
- Korsmeyer SI. (1992). Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: Regulator of cell death. *Blood*;80:879
- Knazek, R.A., Gullino, P., Kohler, P.O., Dedrick, R. (1972) Cell culture o artificial capillaries. An approach to tissue growth in vitro. *Science* 178: 65–67
- Kocher A. A., Schuster M. D., Szaboles M. J., Takuma S.; Burkhoff D., Wang J., Homma S., Edwards N. M., and Itescu S. (2001) Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 7, 430-436.
- Kolb, HJ. Schattenberg A. Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D. (1995). Graft versus leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*. 86:2041-2050.
- Kleinsmith L. J. and Pierce G. B., Jr. (1964) Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res* 24, 1544-1551.
- Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, *et al.* (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*; 105:369-377.
- Krivit, W. & Good Ra. (1957). Simultaneous occurrence of mongolism and leukemia. *J. Dis. Child (AMA)* 94: 289-293
- Kruse, P.F., Jr., Keen, L.N., Whittle, W.L. (1970) Some distinctive characteristics of high density perfusion cultures of diverse cell types. *In Vitro* 6: 75–78.
- Kumar D, Kamp TJ, Lewinter MM. (2005). Embryonic stem cells: differentiation into cardiomyocytes and potential for heart repair and regeneration. *Coron Artery Dis*; 16:111-116.

- Kwok, J., S. Myatt, C. Marson, R.S. Coombes, D. Constantinidou, E. Lam (2008) Thioestrepton Selectively Targets Breast Cancer Cells through Inhibition of Forkhead box M1 Expression. *Molecular Cancer Therapeutics*. 7:2022-2032.
- Landry DW, Zucker HA. (2004). Embryonic death and the creation of human embryonic stem cells. *J Clin Invest*; 114:1184-1186.
- Lanier LL, Testi R, Bindl J, Phillips JH (1989). Identidad de Leu-19 (CD56) antígeno de diferenciación neuronal y la molécula de adhesión celular. *J Exp Med* 169:2233 [PubMed](#)
- Lanzavecchia A. (1996). Mecanismos de captación de antígenos para la presentación. *Curr Opin Immunol*; 8:348-54.
- Leary, J. F., B. M. Ohlsson-Wilhelm, R. Giuliano, S. LaBella, B. Farley, and P. T. Rowley. (1987). Multipotent hematopoietic cell line K562: lineage-specific constitutive and inducible antigens. *Leuk. Res.* 11:807-815.
- Ledesma ,Ismael Mateos. (2000).Historia de la Biología. AGT Editor S.A.
- Leighton, J. (1951). "A spoge matrix method for tissue culture. Formation and organized aggregates of cells *in vitro*". *J. Natl. Cancer Inst.* 12 : 545-561.
- Leighton, J., Mark, R. y Rush, G. (1968). "Patterns of three dimensional growth in collagen coated cellulose sponge : carcinomas and embryonic tissues". *Cancer Res.* 28 : 286-296
- Lewis ID. (2002). Clinical and experimental uses of umbilical cord blood. *Int Med J*; 32:601-609.
- Lindvall O., Kokaia Z., and Martinez-Serrano A. (2004) Stem cell therapy for human neurodegenerative disorders-how to make it work. *Nat Med* 10 **Suppl**, S42-S50.
- Lisker R. (2003). Ethical and legal issues in therapeutic cloning and the study of stem cells. *Arch Med Res*; 34:607-611.
- Lodish, Harvey; Berk, Arnold; Zipursky, S. Lawrence; Matsudaira, Paul; Baltimore, David; Darnell, James E. (2000). "Molecular Cell Biology", WH Freeman and Company.
- Lovell-Badge R. (2001) The future for stem cell research. *Nature* 414, 88-91.
- Lozzio, B.B.; Lozzio, C.B. (1979), "Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line", *Leukemia Research* 3 (6): 363-370.
- Lozzio, B.B.; Lozzio, C.B.; Bamberger, E.G.; Feliu, A.S. (1981), "A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin", *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 166: 546-550.

- Lumelsky N, Blondel O, Laeng P, Velasco I, Ravin R, McKay R. (2001). Differentiation of embryonic stem cells to insulin-secreting structures similar to pancreatic islets. *Science*; 292: 1389-1394
- Lyons, Valerie A. (1999). Fatigue an Malaise, Hematopathology Case. Pittsburgh University.
- Maas-Szabowski, N., Stark, H.-J., Fusenig, N.E. (2002) Cell interaction and differentiation. In Freshney. R.I. and Freshney. M.G., eds, *Culture of Epithelial Cells*, 2nd Ed. New York, John Wiley & Sons, pp. 31–63.
- MacMahon, B. & M.A. Levy. (1964). Prenatal origin of childhood leukemia. Evidence from twins. *N. Engl. J. Med.* 270: 1082-1085.
- Mandelli, F., Avvisati G, Lo Coco, F: (2002). Advances in the Understanding of Acute Promyelocytic leukemia. *Rev. Clin. Exp. Hematol*, 6(1): 60-71.
- March, H.C. (1944). Leukemia in radiologists. *Radiology* 43: 275-278.
- Marks, HM. (1997). The progress of experiment: Science and therapeutic reform in US, 1900-1990. Cambridge. Cambridge Univ. Press.
- Martin G. R. and Evans M. J. (1974). The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell* 2, 163-172.
- Martin G. R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78, 634-7638.
- Martin SJ. (1993). Apoptosis: suicide, execution or murder?. *Trends in cell biology*;3:141-44.
- Martinez-Serrano A. and Bjorklund A. (1997) Immortalized neural progenitor cells for CNS gene transfer and repair. *Trends Neurosci* 20, 530-538.
- Mather, JP, Barnes D (1998). *Methods in Cell Biology*. Vol. 57. Animal Cell Culture Methods. Academic Press.
- Mayani H, Lansdorp PM. (1998). Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/ progenitor cells. *Stem Cells*; 16:153-165.
- Mayani H, Alvarado-Moreno JA, Flores-Guzman P. (2003). Biology of human hematopoietic stem and progenitor cells present in circulation. *Arch Med Res*; 34:476-48
- Mayr, E. (1982). *The Growth of the Biological Thought* (Belknap, Cambridge, MA.
- Mayr, E. (1998). *The Growth of the Biological Thought* (Belknap, Cambridge, MA

- Mazzarello Paolo, (1999). A unifying concept: the history of cell theory, *Nature Cell Biology* 1, e13-e15.
- McCormack MP, Rabbitts TH. (2004). Activation of the T-cell oncogene LM02 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med*; 350:913-922
- McGlave P, De Fabritiis P, Deisseroth A, *et al.* (1994). Autologous transplant therapy for chronic myelogenous leukaemia prolongs survival: results from eight transplant groups. *Lancet*, 343, 1486-1491.
- McHugh PR. (2004). Zygote and "clonote" - The ethical use of embryonic stem cells. *N Engl J Med*; 351:209-211.
- Melo JV. (1996). The diversity of the BCR-ABL fusion proteins and their relationship to leukemia phenotype. *Blood*, 88, 2375-2384.
- Menasche P. (2005). Skeletal myoblast for cell therapy. *Coron Artery Dis*; 16:105-110.
- Meyn RE, Stephens LC, Mason KA, Medina D. (1996). Radiation-induced apoptosis in normal and premoplastic mammary glands in vivo: significance of gland differentiation and P53 status. *Int J Cancer*; 66:466-72.
- Mezey E., Chandross K. J., Harta G., Maki R. A., and McKercher S. R. (2000). Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290, 1779-1782.
- Miller, R.W. (1967). Persons with an exceptionally high risk of leukemia. *Cancer Res.* 27: 2420-2423.
- Miller, J.M., L.D. Miller, C. Olson & K.G. Gillette. (1969). Virus-like particles in phytohemagglutinin-stimulated lymphocyte cultures with reference to bovine lymphosarcoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 43: 1297-1305
- Miller, R.W. (1971). Deaths from childhood leukemia and solid tumors among twins and other sibs in the United States. *J. Natl. Cancer Inst.* 46: 203-209.
- Mitelman F, Levan G, Nilsson PG, Brandt L. (1976). Non-random karyotypic evolution in chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer*; 18:24-30.
- Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Mitelman. (2002). Database of Chromosome Aberrations in Cancer <http://cgap.nci.nih.gov/chromosomes/Mitelman>
- Molldrem JJ, Lee PP, Wang MM, *et al.* (2000). Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia. *Nature Medicine*, 6, 1018-1023.
- Montgomery, D. C. (2001). *Diseno y analisis de experimentos*, Grupo Editorial Iberoamericana.

- Morgan, J.G., Morton, J.H. y Parker, R.C. (1950). "Nutrition of animal cells in tissue culture. I Initial studies on a synthetic medium". *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 73.
- Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *Journal of Immunological Methods.* 65: 55–63.
- Mughal TI, Hoyle C, Goldman JM. (1993). Autografting for patients with chronic myeloid leukemia- The Hammersmith experience. *Stem Cells*, 11, 20-22.
- Mughal TI, Goldman JM. (1995). Chronic myeloid leukaemia: a therapeutic challenge. *Annals of Oncology*, 6, 637-644.
- Mughal TI, Yong A, Szydlo R, *et al.* (2000). The probability of longterm leukaemia free survival for patients in molecular remission 5 years after allogeneic stem cell transplantation for chronic myeloid leukaemia in chronic phase. *The Hematology Journal*, 1(Suppl. 1), 600.
- Munn DH, Pressey J, Beall AC, Hudes R, Alderson MR. (1995). Selective activation induced apoptosis of peripheral T cells imposed by macrophages. *J. Immunol.*;156(2):515-22.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 15;90(18):8424-8
- Nathwani AC, Davidoff AM, Linch DC. (2005). A review of gene therapy for haematological disorders. *Br. J Haematol*; 128:3-17.
- Nelson y Cox. (2000). "Lehninger, Principios de Bioquímica" 3a ed. Ed Omega.
- Neumann, E. (1878). Ueber myelogene Leukämie. *Ver Klin Wochenschr* 15: 69 -72.
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Scholer H, Smith A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct 4.
- Núñez G, Clarke MF. (1994). The Bcl-2 family of proteins: Regulators of cell death and survival. *Trends in Cell Biol*; 4:399-03.
- Núñez G, Merino R, Grillot D, Gonzales-García M. (1994). Bcl-2 y Bcl-x regulatory switches for lymphoid death and survival. *Immunol. Today*;15(12):582-88.
- Nombela, César (2007). *Células madre, encrucijadas biológicas para la Medicina*. Madrid: Edaf. ISBN 978-84-414-1823-3.
- Norbert Krau, Lobo-Dieter Schubert, Olaf Klukas, Petra Fromme, Hor Tobias Witt y Wolfram Saenger. (1996). Photosystem I at 4 Å resolution represents the first structural model of a joint photosynthetic reaction centre and core antenna system. November, Volume 3 Number 11 p965.

- Nowell PC, Hungerford DA. (1960). A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 132, 1497.
- Nguyen DH, Ball ED, Varki A. (2006). Myeloid precursors and acute myeloid leukemia cells express multiple CD33-related Siglecs. *Exp Hematol*. Jun;34(6):728-35.
- Ocaña E, Delgado-Pérez L, Campos-Caro A, Muñoz J, Paz A, Franco R, Brieva JA. (2007). The prognostic role of CXCR3 expression by chronic lymphocytic leukemia B cells. *Haematologica*. Mar;92(3):349-56.
- 37) Paterson JC, Tedoldi S, Craxton A, Jones M
- Odorico J. S., Kaufman D. S., and Thomson J. A. (2001). Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines. *Stem Cells* 19, 193-204.
- Okada Y., Shimazaki T., Sobue G., and Okano H. (2004). Retinoic-acid-concentration dependent acquisition of neural cell identity during in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 275, 124-142.
- Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. (2007) Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*. Jul 19;448(7151):313-7.
- Olsson M., Bentlage C., Wictorin K., Campbell K., and Bjorklund A. (1997). Extensive migration and target innervation by striatal precursors after grafting into the neonatal striatum. *Neuroscience* 79, 57-78.
- Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog. Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*; 74:609-19.
- Onishi Y, Kizaki H. (1994). Apoptosis and diseases. *Hum. Cell*;7(1):27-32.
- Orlic D., Kajstura J., Chimenti S., Jakoniuk I., Anderson S. M., Li B., Pickel J., McKay R., Nadal-Ginard B., Bodine D. M., Leri A., and Anversa P. (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705.
- Osborne BA, Schwartz LM. (1994). Essential genes that regulate apoptosis. *Trends in Cell. Biol.*;4:394-99.
- Osborne B. (1996). Apoptosis and maintenance of homeostasis in the immune system. *Current Opinion in Immunol.*;8(2):245-54.
- Owen-Schaub LB, Angelo LS, Radinsky R, Ware CF. (1995). Soluble Fas/Apo-1 in tumor cell: a potential regulator of apoptosis? *Cancer Letters*;94:1-4.
- Pandur P. (2005). What does it take to make a heart? *Biol Cell*; 97: 197210.
- Pane F, Frigeri F, Sindona M, *et al.* (1996). Neutrophilic-chronic myeloid leukemia: a distinct disease with a specific molecular marker. *Blood*, 88, 2410-2414.

- Parson AB: ((2004).). El Proteus en vigor: las células madre y su promesa de la medicina. Joseph Henry de Prensa
- Pelman, D. (1979). "Use of antibiotics in cell culture media". *Meth. Enzymol.* 58 : 110-116.
- Pera MF, Reubinoff B, Trounson A. (2000). Human embryonic stem cells. *J Cell Sci.* Jan;113 (Pt 1):5-10.
- Peschanski M., Bachoud-Levi A. C., and Hantraye P. (2004) Integrating fetal neural transplants into a therapeutic strategy: the example of Huntington's disease. *Brain* 127,1219-1228
- Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, Mars WM, Sullivan AK, Murase N, et al. (1999). Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science*; 284:1168-1170.
- Phimister EG, Drazen JM. (2004). Two fillips for human embryonic stem cells. *N Engl J Med*; 350:1351-1352
- Pinilla-Ibarz J, Cathcart K, Korontsvit T, *et al.*(2000). Vaccination of patients with chronic myelogenous leukemia with bcr-abl oncogene breakpoint fusion peptides generates specific immune responses. *Blood*, 95, 1781-1787.
- Poiesz, B.J., F.W. Ruscette & A.F. Gagdar, P.A. Bunn, J.D. Minna & R.C. Gallo. (1980). Detection and isolation of type C retrovirus particles from fresh and cultured lymphocytes of a patient with cutaneous T-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 7415-7419.
- Pombo de Oliveira, M.S., F.E. Awad el Seed, L. Foroni, E. Matutes, R. Morilla, L. Luzzatto & D. Catovsky. (1986). Lymphoblastic leukemia in Siamese twins: evidence for identity. *Lancet.* ii: 969-970.
- Porras O. (1993). Trasplante de Médula Osea.. *Rev Méd Hosp Nal Niños Costa Rica*; 26-28(NE):55-76.
- Priester, WA, TJ Mason. (2004). Human cancer mortality in relation to poultry population, by county, in 10 southeastern states. *J Natl Cancer Inst* 53:4549.
- Quaini F, Urbanek K, Beltrami AP, Finato N, Beltrami CA, Nadal- Ginard B, et al. (2002). Chimerism of the transplanted heart. *N Engl J Med*; 346:5-15.
- Reap EA, Felix NJ, Wolthusen PA, Kotzin BL, Cohen PL, Eisenberg RA. (1995). Bel-2 transgenic Lpr mice show profound enhancement of lymphadenopathy. *J Immunol*;155(11):5455-62.
- Reiter, A., Lengfelder, E., Grimwade, D. ((2004). Pathogenesis, Diagnosis and Monitoring of Residual Disease in Acute Promyelocytic leukemia. *Acta Hematol* 12: 55-67.

- Reschad, H. & V. Schilling-Torgau.(1913). Ueber eine neue Leukämie durch echte Uebergangsformen und ihre bedeutung für die Selbständigkeit dieser zellen. *Munch Med Wochenschr.* 60: 1981-1984
- Reubinoff B. E., Pera M. F., Fong C. Y., Trounson A., and Bongso A. (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18, 399-404.
- Rickard, C.G., J.E. Post, F. Noronha & L.M. Barr. (1969). A transmissible virus-induced lymphocytic leukemia of the cat. *J. Natl. Cancer Inst.* 42: 987-1014.
- Rideout WMIII, Hochedlinger K, Kyba M Daley GO Jaenisch. (2002). Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell*; 109:17-27.
- Robertson E. (1986). Pluripotential stem cell lines as a route into the mouse germ line *Trends Genet*, 2: 9-13.
- Robertson EJ. (1997). Derivation and maintenance of embryonic stem cell cultures. *Methods Mol Biol.*;75:173-84.
- Robinson SP , Saraya K, Reid CDL. (1998). Aspectos de desarrollo de las células dendríticas *in vitro e in vivo. Leuk Linfoma de*; 29:477-90.
- Rocha V, Sanz G, Gluckman E, (2004). Eurocord and European blood and marrow transplant group. Umbilical cord blood transplantation. *Curr Opin Hematol*; 11:375-385.
- Rosa M Reboloso García, Enrique Báez de la Fuente, Roberto Hernández Valdés, Ricardo M Cerda Flores, Elva Cortés Gutiérrez, Martha Dávila Rodríguez. (2004). Evaluacion del tratamiento sti571 en pacientes con leucemia mieloide crónica mediante la técnica de fish. VIII Reunión Delegacional de Investigación Médica. Edición Especial 4.
- Rosenthal N. (2003). Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *N Engl J Med*; 349:267-274
- Rossi F. and Cattaneo E. (2002). Opinion: stem cell therapy for hematological diseases: dreams and reality. *Nat Rev Neurosci* 3, 401-409.
- Rowley, J.D. (1973). A new consistent chromosome abnormality in chronic myelogenous leukemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature* 243: 290-293.
- Rowley, P. T., B. M. Ohlsson-Wilhelm, B. A. Farley, and S. LaBella. (1981). Inducers of erythroid differentiation in K562 human leukemia cells. *Exp. Hematol.* 9:3237.

- Rubio F., Kokaia Z., Arco A., Garcia-Simon M., Snyder E., Lindvall O., Satrustegui J., and Martinez-Serrano A. (1999) BDNF gene transfer to the mammalian brain using CNS-derived neural precursors. *Gene Ther* 6, 1851-1866.
- Rutishauser U, Grumet M, Edelman GM (1983). Molécula de adhesión celular neural inicial media interacciones entre las neuronas de la médula espinal y las células musculares en la cultura. *J Cell Biol* 97:145 PubMed
- Ryningen A, Ersvaer E, Øyan AM, Kalland KH, Vintermyr OK, Gjertsen BT, Bruserud Ø. (2006). Stress-induced in vitro apoptosis of native human acute myelogenous leukemia (AML) cells shows a wide variation between patients and is associated with low BCL-2:Bax ratio and low levels of heat shock protein 70 and 90. *Leuk Res. Dec*;30(12):1531-40. Epub 2006 Apr.
- Sandel MJ. (2004). Embryo ethics - The moral logic of stem-cell research. *N Engl J Med*; 351:207-209.
- Sawyers CL. (1999). Chronic myeloid leukemia. *New Engl J Med*, 340, 1330- 1338.
- Schwartz RH. (1993). Immunological Tolerance. *Fundamental Immunology*, Third Edition, edited by William E. Paul Raven Press Ltd, New York.
- Selkirk SM. (2004). Gene therapy in clinical medicine. *Postgrad Med J*; 80: 560-570
- Skakkebaek N. E., Berthelsen J. G., Giwercman A., and Muller J. (1987). Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl* 10, 19-28
- a) Shamblott M. J., Axelman J., Wang S., Bugg E. M., Littlefield J. W., Donovan P. J., Blumenthal P. D., Huggins G. R., and Gearhart J. D. (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95,13726-13731.
- b) Shamblott M. J., Axelman J., Littlefield J. W., Blumenthal P. D., Huggins G. R., Cui Y., Cheng L., and Gearhart J. D. (2001) Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 113-118.
- Shepherd P, Suffolk R, Hasley J, *et al.* (1995). Analysis of molecular breakpoint and mRNA transcripts in a prospective randomized trial of interferon in chronic myeloid leukaemia: no correlation with clinical features, cytogenetic response, duration of chronic phase, or survival. *Br J Haematol*, 89, 546-554.
- Shortman K , Caux C. (1997). El desarrollo de las células dendríticas: múltiples vías a la naturaleza de los adyuvantes. *Células Troncales* de; 15:409-19.

- Siegler U, Kalberer CP, Nowbakht P, Sendelov S, Meyer-Monard S, Wodnar-Filipowicz A. (2005). Activated natural killer cells from patients with acute myeloid leukemia are cytotoxic against autologous leukemic blasts in NOD/SCID mice. *Leukemia*. Dec;19(12):2215-22.
- Simon R. (2001). Design and analysis of clinical trials in "Cancer.Principes and practice of Oncology". 6th Edition- V-de Vita.. Lippincott Williams and Wilkins.
- Simpson, C.L., L.H. Hempelman & L.M. Fuller. (1955) Neoplasia in children treated with X-rays in infancy for thymic enlargement. *Radiology* 64: 840-845.
- Smith SW, McLaughlin KA, Osborne BA. (1995). Molecular events in thymocyte apoptosis. *Curr Top Microbiol Immunol*;200:147-62.
- Smith A. G., Heath J. K., Donaldson D. D., Wong G. G., Moreau J., Stahl M., and Rogers D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-690.
- Smith AG. (1992). Mouse embryo stem cells: their identification, propagation and manipulation. *Semin Cell Biol*. Dec;3(6):385-99. R
- Smits AM, van Vliet P, Hassink RJ, Goumans MJ, Doevendans PA. (2005). The role of stem cells in cardiac regeneration. *J Cell Mol Med*; 9:25-36.
- Silvestri F, Ribatti D, Nico B, Silvestri N, Romito A, Dammacco F. (1995). Apoptosis or programmata cell death: regulatory and pathophysiological mechanisms (editorial). *Ann Ital Med Int*;10(1):7-13
- Siminovitch L., McCulloch E. A., and Till J. E. (1963) The Distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Physiol* 62, 327-336.
- Sirchia G, Rebulli P. (1999). Placental/umbilical cord blood transplantation. *Haematologica*; 84:738-747..
- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, SSA. (1997). Epidemiología. México: SSA.
- Slavin S, Nagler A, Naparstek E, *et al.* (1998). Nonmyeloablative stem cell transplantation with cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood*, 91, 756-763.
- Slye, M. (1931). The relation of heredity to the occurrence of spontaneous leukemia, pseudoleukemia, lymphosarcoma and allied diseases in mice. Preliminary report. *Am. J. Cancer* 15: 1361-1386.
- Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, *et al.* (1984). Prognostic discrimination in "goodrisk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*, 63, 789-799.

- Soria B, Skoudy A, Martin F. (2001). From stem cells to beta cells: new strategies in cell therapy of diabetes mellitus. *Diabetologia*. Apr;44(4):407-15.
- Spencer A, Brookes PA, Kaminski E, *et al.* (1995). Cytotoxic T-lymphocyte precursor frequency analysis in bone marrow transplantation with volunteer unrelated donors: value in donor selection. *Transplantation*, 59, 1302-1308.
- Steinberg, A.G. (1957). A genetic and statistical study of acute leukemia in children, pp. 353-356. *In* Proceedings of the third national cancer conference. J.B. Lippincott, Philadelphia.
- Stevens L. C. (1967a). Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. *J Natl Cancer Inst* 38, 549-552.
- Stevens L. C. (1967b). The biology of teratomas. *Adv Morphog* 6, 1-31.
- Stocum DL. (2005). Stem cells in CNS and cardiac regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol*; 93:135-159.
- Strasser A. Apoptosis. Death of a T cell. *Nature* 1995;373(6513):365-6.
- Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. (1993). Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*;75:1169-78.
- Summer R, Kotton DN, Liang S, Fitzsimmons K, Sun X, Fine A. (2005). Embryonic lung side population cells are hematopoietic and vascular precursors. *Am J Respir Cell Mol Biol*;
- Sylvester KG, Longaker MT. (2004). Stem cells: review and update. *Arch Surg*; 139:93-99.
- Szilvassy SJ. (2003). The biology of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res*; 34:446-460.
- Szydio R, Goldman JM, Klein JP, *et al.* (1997). Results of allogeneic bone marrow transplants using donors other than HLA-identical siblings. *J Clin Oncol*, 15, 1767-1777.
- Tanaka H, Shilbagaki I, Shimada Y, Wagata T, Imamura M, Ishizaki K. (1996). Characterization of p53 gene mutations in esophageal squamous cell carcinoma cell lines: Increased frequency and different spectrum of mutations from primary tumors. *Int J. Cancer*; 65:372-76.
- Temple S. (2001) The development of embryonic stem cells. *Nature* 414, 112-117.
- Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, *et al.* (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*; 416:542-545.

- Theise ND, Badve S, Saxena R, Henegariu O, Sell S, Crawford JM, et al. (2000). Derivation of hepatocytes from bone marrow cells in mice after irradiation-induced myeloablation. *Hepatology*; 31:235-240.
- Thiery JP, Duband JL, Rutishauser U, Edelman GM (1982). Moléculas de adhesión celular en la embriogénesis de pollo temprano. *Proc Natl Acad Sci EE.UU.* 79:6737 [PubMed](#).
- a) Thomson J. A., Kalishman J., Golos T. G., Durning M., Harris C. P., Becker R. A., and Hearn J. P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7844-7848.
- b) Thomson J. A., Kalishman J., Golos T. G., Durning M., Harris C. P., and Hearn J. P. (1996). Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* 55, 254-259.
- c) Thomson J. A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S. S., Waknitz M. A., Swiergiel J. J., Marshall . S., and Jones J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Torchiana E., Lulli L., Cattaneo E., Invernizzi F., Orefice R., Bertagnolio B., Di Donato S., and Finocchiaro G. (1998) Retroviral-mediated transfer of the galactocerebrosidase gene in neural progenitor cells. *Neuroreport* 9, 3823-3827.
- Tuch BE, Scott H, Armati PJ, Tabiin MT, Wang LP. (2003). Use of human fetal tissue for biomedical research in Australia, 1994-2002. *Med J Aust*; 179:547-550.
- Tucek-Scabo C, Andjelic S, Lacy E, Elkon KB, Nikolic-Zingic J. (1996). Surface T cell Fas Receptors/CD95 Regulation, in vivo Activation and Apoptosis. *J. Immunol.*; 156(1):192-00.
- Tucker, MA, CN Coleman, RS Cox, A Varghese, SA Rosenberg. (1988). Risk of second cancers after treatment for Hodgkin's disease. *New Engl J Med* 318:76-81.
- Tucker, M.A., A.T. Meadows, J.D. Boice Jr, M. Stovall, O. Oberlin, B.J. Stone, J. Birch, P.A. Voute, R.N. Hoover, & J.F. Fraumeni Jr. (1987). Leukemia after therapy with alkylating agents for childhood cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 78: 459-464.
- Urba. (1993). Lymphocytic lymphomas. En *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, dirigido por VTJ.

- Urbano-Ispizua A, Brunet S, Solano C, Moraleda JM, Rovira M, Zuazu J, de La Rubia J, Bargay J, Caballero D, Diez-Martin JL, Ojeda E, Perez de Oteiza JP, Ferra C, Espigado I, Alegre A, de La Serna J, Torres P, Riu C, Odriozola J, Rozman C, Sierra J, Garcia-Conde J, Montserrat E. (2001). Allogeneic transplantation of CD34+- selected cells from peripheral blood in patients with myeloid malignancies in early phase: a case control comparison with unmodified peripheral blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*, Aug; 28(4):349-54.
- Van der Kooy D, Weiss S. (2000). Why stem cells? *Science*; 287:1439.
- Velpeau, A. (1827). Sur la resorption du pus et sur l'alteration du sang dans les maladies cliniques de persécution névrotique. Premier observation. *Rév. Méd.* 2: 216.
- Virchow, R. (1845). Weisses Blut. *Notiz Geb Natur Heilk.* 36: 152-156.
- Virchow, R. (1856). Die Leukämie, pp. 190-211. *In* R. Virchow (ed.). *Gesammelte Abhandlungen zur Wissenschaftlichen Medizin*. Frankfurt, Meidinger.
- Wagner J., Akerud P., Castro D. S., Holm P. C., Canals J. M., Snyder E. Y., Perlmann T., and Arenas E. (1999) Induction of a midbrain dopaminergic phenotype in *Nurr1*-overexpressing neural stem cells by type 1 astrocytes. *Nat Biotechnol* 17, 653-659.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, et al. (2004). Mesenchymal stem cell in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*; 22:1330-1337.
- Weimann J. M., Johansson C. B., Trejo A., and Blau H. M. (2003). Stable reprogrammed heterokaryons form spontaneously in Purkinje neurons after bone marrow transplant. *Nat Cell Biol* 5, 959-966.
- Weimann JM, Charlton CA, Brazelton TR, Hackman RC, Blau HM. (2003). Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100:2088-2093.
- Weimann JM, Charlton CA, Brazelton TR, Hackman RC, Blau HM. (2003). Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100:2088-2093.
- Weinelt S., Peters S., Bauer P., Mix E., Haas S. J., Dittmann A., Wree A., Cattaneo E., Knoblich R., Strauss U., and Rolfs A. (2003) Ciliary neurotrophic factor overexpression in neural progenitor cells (ST14A) increases proliferation, metabolic activity, and resistance to stress during differentiation. *J Neurosci Res* 71, 228-236.
- Weissman IL. (2000). Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*; 287:1442-1446.

- Wernig M, Meissner A, Foreman R, Brambrink T, Ku M, Hochedlinger K, Bernstein BE, Jaenisch R. (2007). In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. Jul 19;448(7151):318-24.
- 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., and Gough N. M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687.
- Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*; 385:810-813.
- Wognum A W, Eaves AC, Thomas TE. (2003). Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Arch Med Res*; 34:461-47.
- Wollert KC, Drexler H. (2005;). Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ Res* 96:151-163.
- Wurmser A. E. and Gage F. H. (2002). Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature* 416, 485-487
- Xu C., Inokuma M. S., Denham J., Golds K., Kundu P., Gold J. D., and Carpenter M. K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 971-974.
- Yang, J., Elias, J.J., Petrakis, N.L., Wheelings, S.R. y Nandi, S. (1981). "Effects of hormones and growth factors on human mammary epithelial cells in collagen cell culture". *Cancer Res.* 41 : 1021-1027.
- Yang E, Zha J, Jockel J. (1995). Bad a heterodimeric partner for Bcl-2XI and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell*; 80:285-91.
- Ying Q. L., Nichols J., Evans E. P., and Smith A. G. (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-54.
- Yoon YS, Lee N, Scadova H. (2005). Myocardial regeneration with bone-marrow-derived stem cells. *Biol Cell*; 97:253-263.
- Zhu HH, Xu KL, Pan XY, Liu JQ, Chen FX, Huang YH. (2003). Specific anti-leukemic cell effect mediated by dendritic cells pulsed with chronic myelogenous leukemia lysate antigen in vitro. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. Jun;11(3):278-81.
- Zuelzer, W. y D. Cox. (1969). Genetic aspects of leukemia. *Semin. Hematol.* 6: 228-249.

ANEXO I

ENSAYO CIENTIFICO: VACUNA CONTRA LA LEUCEMIA

Un grupo de pacientes oncológicos, enfermos de leucemia, recibirán dentro de unas semanas una vacuna desarrollada en el King's College de Londres. En efecto, un grupo de investigadores británicos ha desarrollado un tratamiento alternativo contra la leucemia que podría reemplazar a la quimioterapia y el trasplante de médula.

Básicamente se trata de una vacuna capaz de activar el propio sistema inmunológico del paciente, capacitándolo para que pueda luchar con éxito contra la enfermedad. Sus desarrolladores creen que este principio también podrá ser utilizado para tratar otros tipos de cánceres.

Se denomina leucemia a un grupo de enfermedades malignas de la médula ósea, cáncer hematológico que tienen como resultado un aumento incontrolado de la cantidad de leucocitos o glóbulos blancos clonales en la propia médula ósea. En general, estos suelen pasar a la sangre periférica aunque hay casos en que no lo hacen.

La leucemia es el cáncer más frecuente en la infancia, con una tasa de afectación de 3 o 4 casos por cada 100,000 niños menores de 15 años. Su principal tratamiento es la quimioterapia o el trasplante de médula ósea. Pero una nueva forma de tratamiento, menos traumática que las actuales, comenzará a aplicarse en el transcurso de este año.

La leucemia provoca un aumento incontrolado de la cantidad de leucocitos. En efecto, a principios de este año comenzará a aplicarse en un grupo de pacientes una nueva clase de tratamiento, puesto a punto por los científicos del King's College de Londres y que promete ser muy efectivo para impedir la propagación de las células cancerosas. Los pacientes que han sido seleccionados para recibir en primer lugar esta nueva vacuna ya han sido tratados con quimioterapia o se les haya realizado un trasplante de médula.

Si todo sale como los especialistas aseguran, la vacuna comenzará a ser aplicada a pacientes que no hayan recibido trasplantes. Se trata de personas que padecen un tipo de leucemia conocida como AML, que es de hecho la más común en pacientes adultos. La vacuna no intenta prevenir la enfermedad, sino que debe ser aplicada una vez que el paciente ya ha sido diagnosticado, dado que el fármaco actúa reprogramando el sistema inmunológico para que sea capaz de capturar las células cancerígenas y destruirlas.

El estudio que permitió la creación de esta vacuna fue realizado por un equipo dirigido por el profesor Ghulam Mufti y los doctores Farzin Farzaneh y Nicola Hardwick, todos del University College London. Durante el desarrollo del fármaco se emplearon técnicas y trucos similares a los que se han probado con éxito en el control del virus HIV y los resultados de su trabajo fueron publicados en el prestigioso Journal of Cancer Immunology.

Según explican sus creadores, la vacuna funciona "ayudando" al sistema inmunológico a reconocer las células cancerígenas en el momento que se reproducen, previniendo una recaída de la enfermedad. Ha sido desarrollada a partir de células de la sangre del paciente manipuladas en el laboratorio. Las células originales fueron modificadas para agregarles dos genes extra que actúan como una suerte de "banderas" que ayudan a identificar la leucemia. El efecto concreto es que su aplicación consigue aumentar la capacidad natural del sistema inmunológico para buscar y destruir las células cancerosas.

Farzin Farzaneh explica que si los ensayos que comenzarán en unas semanas tienen éxito, podrían desarrollarse tratamientos similares para tratar otros tipos de leucemias o

de cánceres. “Es el mismo concepto de las vacunas normales. El sistema inmunológico ha evolucionado para detectar elementos extraños y destruirlos. Este mecanismo nos brinda una herramienta para tratar el cáncer.” El costo del tratamiento solo es un 10% más caro que un tratamiento convencional promedio, por lo que el dinero no debería ser un obstáculo para si tienen éxito que esta vacuna se convierta en el nuevo tratamiento contra la leucemia (<http://www.prensa-latinalasvegas.com/2010-01/07-2576.htm>).