

La racionalidad terapéutica en la Medicina regenerativa con células troncales embrionarias o de adulto. Gemelación.

Natalia López Moratalla

Conferencia en la Real Academia de Farmacia, 2003.

1. Medicina regenerativa y células troncales.

La Medicina regenerativa, dirigida a sustituir células destruidas en órganos específicos en diversas enfermedades, tiene su base en la capacidad, asombrosa, pero real, de las células troncales de convertirse, tras una serie de divisiones, en células específicas. Podemos decir que con estas células se ha abierto una esperanza inesperada. Pero esta esperanza se ha visto enredada en medio de tensiones, por el hecho de que una de las fuentes de las células troncales puedan ser embriones humanos precoces, en principio sobrantes de la práctica de la Fecundación *in vitro*. No hay duda de que estas células troncales poseen un gran potencial de desarrollo y transformación, y algunos investigadores pensaron pronto no sólo en el conocimiento científico que pueden aportar, sino también en su uso para el tratamiento de enfermedades degenerativas graves.

Que el hombre sea sujeto-objeto y beneficiario de esas investigaciones, y de los posibles usos terapéuticos, otorga a este trabajo científico una evidente connotación ética. ¿Es neutral la ciencia a la hora de valorar la forma de obtener los posibles conocimientos? ¿Se justificarían sus aplicaciones, si éstas suponen, como punto de partida, la destrucción o la mutilación de vidas humanas? La ciencia no puede ser neutral en este tema. La destrucción de la vida de un ser humano vivo es la línea roja que califica la actividad humana científica, médica, o de política científica. La ponderación del valor de una vida humana, en una situación objetivamente precaria como es la de los embriones sobrantes criopreservados durante largos periodos de tiempo, frente al valor de un estudio científico, riguroso, nos remite a la cuestión del valor de un ser humano en la fase previa a la implantación en el útero materno. Ciertamente el trazado que marca esa línea -“ser humano vivo”- puede ser más o menos fino, más o menos grueso, según creencias, increencias, e ideologías.

Importa, y mucho, mantener la ciencia a salvo de falsificaciones. Hay que evitar que la interpretación y discusión de unos datos queden sujetas a una manipulación por convicciones. Y aquí me parece que es oportuno decir que no se trata de imponer silencio en nombre de la neutralidad de la ciencia. Alguien ha señalado con acierto[1]: “cuando un científico opta por atenerse a lo que honestamente considera una mejor descripción de la realidad, enfrentándose a otros colegas, que prefieren ignorar datos incómodos, no está practicando una ciencia libre de valores; está más bien permitiendo que su paráisi científica sea orientada por unos valores *mejores* que los de sus colegas. Y la adhesión a esos valores no sólo no es una amenaza para la objetividad científica sino que más bien abre la posibilidad de avanzar hacia esa objetividad... El problema es entonces explicar en qué sentido unos valores son mejores que otros y cómo justificar nuestras afirmaciones...”

Las terapias celular y regenerativa, que no son una panacea universal, ni tampoco una simple promesa; aparecen como un potencial real, interesante, que exige un uso riguroso de la racionalidad científica y encauzarlas así, sin ambivalencias, ni técnicas, ni éticas. La racionalidad científica exige un conocimiento actualizado, es decir liberado de dogmatismos que se establecieron en el pasado (y que por reciente que parezca en la ciencia biológica, el pasado se mide por decenios); *riguroso*

(liberado de prejuicios, creencias o increencias, que pretendan hacer decir a la ciencia lo que la ciencia no puede decir, ni desdecir) y *honesto* (liberado de intereses que, pudiendo ser en sí mismos legítimos, dejan de serlo al ocultarse tras el interés proclamado). El estudio y la divulgación, para quien no está de lleno metido en este campo de investigación, se hace particularmente exigente por el hecho de que algunas revistas científicas, de prestigio e impacto, han tomado una postura previa acerca del posible potencial terapéutico de algunos de los tipos de células troncales.

La investigación biomédica que busca la regeneración del daño celular mediante la potenciación de las células troncales puede, y debe, recibir orientación de conocimientos adquiridos y ratificados en estos últimos años:

En primer lugar, el descubrimiento de que los tejidos y órganos del cuerpo humano tienen capacidad, por sí mismos, para reparar los daños y regenerarse. El organismo guarda reservas de células troncales cuya maduración se induce de forma muy estricta, y también diferente, según su naturaleza y el tipo celular a los que deben, de forma natural, sustituir y recambiar. Por ello, la función propia de los diferentes tipos de células troncales del organismo ya formado (en nomenclatura habitual, células troncales de adulto), y los factores que inducen su multiplicación y su maduración a células especializadas en el organismo *in vivo*, son conocimientos necesarios y previos para una Terapia regenerativa racionalmente planteada.

En segundo lugar un hecho, que quizá sorprende todavía. Hoy sabemos ya qué es un embrión humano de pocas células, y también qué es un simple conjunto de células, organizado en diversas estructuras multicelulares, sin constituir un organismo. La masa celular interna del embrión de unos cinco días son células troncales embrionarias de las que parten todos los sistemas, tejidos y órganos de un individuo. Precisamente porque se conoce la información que aporta a cada célula, o tipo celular, el estar formando parte de esa unidad que es un cuerpo vivo en sus diferentes fases temporales, se tiene la posibilidad de cambiar su trayectoria funcional para producir diversos tipos celulares que sustituyan la función de células dañadas por la enfermedad.

El significado biológico y la función natural de las células troncales adultas y de las células troncales embrionarias son bien diferentes; las terapias que puedan derivarse del uso de unas u otras no son opcionales desde el punto de vista técnico[2]. En el caso de las células troncales adultas se trata, en la medida de lo posible, de inducir y potenciar *in vivo* la función que ya naturalmente poseen. El posible uso terapéutico de las células troncales embrionarias supondrá siempre sacarlas de su contexto natural –un embrión en desarrollo– crecerlas, madurarlas y transferirlas al enfermo. Incluso si se pudieran evitar los problemas éticos, graves, de producción y uso de embriones como mero medio en procesos terapéuticos, la agresividad en sí de tales procesos los hace insolventes médicamente por desproporción de los riesgos. No son, por tanto, opciones paralelas; las células embrionarias no son, sin más, una alternativa terapéutica a las células de adulto, o a la inversa.

Hay que investigar a fondo las células de adulto para conocer su función y capacidades y transferir de manera progresiva esos conocimientos para su uso terapéutico. El estudio de las células embrionarias puede aportar, sin duda, conocimientos valiosos, pero no son, en sí mismas, una posibilidad terapéutica. Y no lo serán, al menos, que se pudieran obtener sin riesgo, de cada uno y en los primeros días de vida, y guardarlas en prevención de su uso en caso de enfermedad. Actualmente se puede contar con la conservación de la sangre del cordón umbilical, rica en células troncales muy inmaduras y sin riesgos para "el donante", incluso para él mismo en el futuro. El acaloramiento del debate social actual oculta, con frecuencia, que, por ahora, se trata sólo de investigar con las células madre embrionarias para conseguir conocimientos que podrán permitir avances en la medicina. No son la receta mágica para aplicarlas a un cerebro, o un páncreas, dañados, o a una médula destrozada. No se puede permitir que se creen en los enfermos falsas

expectativas. Y ésta, en mi opinión, es una responsabilidad ética seria de toda la comunidad científica.

2. Células troncales multipotentes y pluripotentes del organismo adulto.

En 1999[3] se demostró que las células troncales no tienen que proceder necesariamente de embriones; a lo largo del 2001 se mostró que existen en los tejidos de organismos adultos y son capaces de diferenciarse y dar origen a células especializadas[4]. Las células troncales de adulto son responsables de mantener los tejidos en condiciones fisiológicas, y de repararlos en caso de alteración o daño. Se conoce su presencia en tejidos que derivan de las tres capas germinales: médula ósea, sangre periférica, sangre del cordón umbilical, cerebro, médula espinal, grasa, pulpa dentaria, vasos sanguíneos, músculo esquelético, epitelio de la piel y tejido conjuntivo, córnea, retina, hígado y los conductos del páncreas. Hasta hace poco, se consideraba que estas células troncales eran específicas de tejido -es decir, capaces de generar sólo los tipos de células presentes en el lugar en el que residen-, pero estudios recientes demuestran, que estas de las células madre de adulto poseen una enorme plasticidad. Sustituido su entorno natural por otro, ejecutan el programa de diferenciación que es intrínseco de la célula, pero, al mismo tiempo, cambian el programa de acuerdo con las nuevas señales de diferenciación que recibe. Así el paradigma inicial de que las células madre de adulto tienen restringida su potencialidad ha cedido ante la evidencia creciente de que esas células contribuyen a otros tipos celulares cuando están expuestas a las influencias del entorno apropiadas[5].

A lo largo de los años 2002 y 2003 se ha puesto de manifiesto que las células troncales de adulto tienen características propias y diferentes de las embrionarias[6]. Sin embargo, algunas de ellas, como las células troncales hematopoyéticas (HSC), cumplen además los criterios establecidos para definir las células troncales embrionarias: a) sufren unas divisiones múltiples y secuenciales renovadoras, un requisito para el mantenimiento de la población; b) las células hijas que provienen de una sola célula madre se diferencian en más de un tipo celular; c) pueden repoblar el tejido de origen cuando se transplantan a un tejido dañado. Así, una célula troncal hematopoyética (HSC) puede sufrir divisiones asimétricas autorenovadoras, da lugar a todos los elementos sanguíneos, reconstituye el sistema hematopoyético cuando se transplanta a tejidos irradiados letalmente, y se diferencia cuando se transfiere a animales no dañados. También las células troncales neurales (NSC) pueden repoblar el tejido de origen.

2.1. Plasticidad

Se denomina plasticidad a la capacidad de células troncales específicas de un tejido para adquirir el destino de tipos celulares distintos de los de su origen. El cambio es lento y no en todas ellas la plasticidad es el resultado de una sola célula troncal que se diferencia en más de una línea. Es lógico que a medida que el organismo crece y madura disminuya la necesidad de restringir el potencial de diferenciación. Efectivamente, las células del embrión temprano se encuentran en estrecha proximidad y, ya antes de alcanzar el estadio de blastocisto, se ven expuestas a grupos superpuestos de señales extracelulares. Esto requiere el uso de mecanismos autónomos de la célula (niveles de expresión del gen Oct 4, que codifica un factor de transcripción relacionado con el mantenimiento de totipotencia en las células embrionarias y germinales[7]) para restringir la potencialidad de seguir determinados destinos. En embriones humanos, Oct-4 está presente en todos los estadios desde el oocito no fecundado hasta blastocisto[8], y su expresión en las células totipotentes de la masa celular interna es muy superior a la detectada en las células diferenciadas del trofoblasto[9]. Oct-4 también está presente en células troncales embrionarias humanas[10]. Pero a medida que el organismo crece, y especialmente en la fase adulta, las células madre guardadas en diferentes tejidos pueden estar aisladas espacialmente en nichos, donde no están expuestas a señales

inductivas, presentes en otros tejidos, precisamente por la organización espacial[11]. Son por tanto las células madre de adulto[12], células madre multipotenciales capaces in vivo de regenerar su propio tejido u otro; y capaces, cultivadas *in vitro*, de diferenciarse a células cuyo origen está en una capa embrionaria diferente.

La médula ósea contiene células troncales HSC, mesenquimales (MSC) y células progenitoras endoteliales. Tras un trasplante de médula ósea a un tejido irradiado letalmente, se vio que las células que se formaron eran de linaje mesodérmico además del hematopoyético. La médula ósea contiene células troncales de naturaleza multipotente, capaces de diferenciarse a células de los linajes de las tres capas germinales. Sin duda, los datos más significativos de estos estudios, son los que demuestran la existencia en el organismo adulto de una reserva de células madre pluripotenciales. En efecto, se ha identificado un tipo de célula madre en la médula ósea murina y de rata (MAPC) *pluripotente* y por tanto equivalente a una célula madre embrionaria en cuanto a potencialidad[13]. Estas células presentan, como las células embrionarias, un nivel elevado de Oct-4 y marcadores de células inmaduras, y de embrionarias, como el Rex-1 y el SSEA-1; al igual que las células madre embrionarias contribuyen a linajes celulares de las tres capas germinales. Las humanas son capaces también de un extenso crecimiento *in vitro* y se diferencian para dar células de diferentes tejidos[14].

Varios fenómenos están en el origen de la plasticidad de las células troncales de adulto: a) células troncales multi o pluripotentes, precursores definidos de células troncales somáticas, persisten en la vida postnatal mas allá de los primeros estadios de la embriogénesis; b) las células troncales específicas de tejidos están presentes en distintos órganos. Está bien establecido el hecho de que las células troncales hematopoyéticas HSC salen del espacio de la médula ósea, circulan por la sangre periférica y llegan a distintos órganos. Por lo tanto, esas células se encontrarán en otros tejidos diferentes, como puede ser el músculo; c) las células sufren desdiferenciación y rediferenciación. La información genética se puede reprogramar para que las células somáticas se desdiferencien en células pluripotentes. A su vez, células de un linaje pueden cambiar y tener un fenotipo diferente. *in vitro*, la plasticidad puede ser, en algún caso, resultado de la fusión de la célula donante con las que residen en el órgano. El cocultivo de células de tejidos adultos con células troncales embrionarias da lugar a fusión. Algunos trabajos han mostrado que, a veces, en el cultivo de diferenciación de células madre de adulto ocurre una fusión espontánea entre estas células y el lecho de células embrionarias ES sobre el que crecen[15]; las células híbridas expresan marcadores específicos de células embrionarias y el factor de transcripción Oct4 específico de células pluripotentes. La hibridación por electrofusión de una célula embrionaria ES con un timocito da lugar a una reprogramación, que la rejuvenece y le aporta características de célula madre embrionaria[16].

2.2. Uso en la terapia de enfermedades

Fuentes celulares

Los hallazgos relacionados con la plasticidad de las células troncales adultas plantearon la conveniencia de estudiar sus posibles usos en terapias regenerativas e, incluso, como vehículo de genes específicos en terapia génica. Inicialmente se pensó que el aislamiento y el cultivo de células troncales de tejidos adultos tendrían serias limitaciones técnicas en el ser humano, puesto que el uso terapéutico estaría ligado estrechamente a la posibilidad práctica de multiplicarlas *in vitro* en un modo eficiente. Sin embargo, por una parte, existe una gran reserva de células con carácter pluripotencial en la médula ósea con esa función precisamente. Estas células pueden utilizarse de forma autóloga, crecen, y su injerto no genera tumores. Son, por tanto, el tipo de célula madre que posee en principio las mejores características para la terapia celular. Pueden dar origen a

músculo[17] o a células hepáticas[18], y células musculares y cardiomiocitos[19]; pueden regenerar el sistema hematopoyético[20]. Se pueden usar en terapia génica[21] y en la reconstrucción de extremidades[22]. Un primer ensayo clínico se efectuó, con éxito, usando las células troncales del mesénquima de la médula ósea para el tratamiento de un niño con una osteogénesis imperfecta[23].

Es muy interesante el descubrimiento[24] de cómo se movilizan las células madre de la médula ósea, ya que las que están en circulación tienen la misma plasticidad que las que están aún asentadas en la médula ósea[25]. Se ha podido demostrar en el ratón, que la inyección de células madre hematopoyéticas (definidas funcionalmente por su capacidad de repoblar la médula ósea después de un trasplante) dio lugar a la producción de células de la sangre, de los conductos biliares, pulmón, tracto intestinal y piel[26]. Por otra parte las células troncales mesenquimatosas expresan suficiente cantidad de telomerasa para mantener los telómeros con una longitud constante, lo que hace posible una alta multiplicación; esta expresión no alcanza los niveles elevados típicos de las células troncales embrionarias o las células tumorales.

Se ha descrito otra fuente abundante de células madre de adulto con gran plasticidad, que es la grasa[27]; las células troncales del tejido adiposo, obtenidas del material de la liposucción, son capaces de diferenciarse *in vitro* y dar músculo, hueso y cartílago; incluso células nerviosas[28]. Diversas células progenitoras, más maduras, pueden completar su diferenciación en el entorno adecuado; y se han transdiferenciado *in vitro* reprogramando su información genética. Por ejemplo, se ha podido convertir células de la piel en linfocitos T, necesarios para tratar al paciente[29] por introducción de los factores citoplásmicos.

Procedimientos

El procedimiento de uso, la fuente de obtención, y las características de las células troncales o progenitoras a elegir, obviamente dependen en primer lugar de la enfermedad a tratar: de la causa de la destrucción de células concretas. Analizamos brevemente tres supuestos diferentes en relación con la causa de la muerte celular.

Lesión “accidental”: Infarto de miocardio. La causa de la lesión es un “accidente” que destruye un área de cardiomiocitos. El trasplante de corazón puede ser sustituido por hacer llegar a la zona del órgano afectado células que reemplacen a las que han muerto[30]. Experimentos con animales han demostrado que las células troncales de médula ósea pueden diferenciarse y dar células de músculo cardíaco[31]; y que cuando los mioblastos esqueléticos se inyectan en músculo cardíaco de un animal que ha sufrido un ataque cardíaco las células troncales significativamente inducen la función cardíaca y la capacidad de ejercicio[32]; en ocasiones las células inmaduras, trasplantadas a un tejido muscular dañado, se han transformado en células musculares adultas sanas fusionándose con las originales dañadas y regenerándolas. Se ha comprobado en animales que es posible un implante heterólogo de ratón a rata de células troncales mesenquimatosas[33]; las células han sustituido a las dañadas que son funcionales; se investiga el mecanismo de tolerancia en vistas al tratamiento del infarto agudo con células de donante. Se ha publicado recientemente[34] la regeneración del corazón de un paciente usando este protocolo. La transferencia de células inmaduras (mioblastos) procedentes de una biopsia muscular del propio paciente está en fase clínica y ha conseguido ya en un número considerable de enfermos una clara regeneración del miocardio. Esta técnica arranca de 1996 y se ha ido consolidando en centros sanitarios de diversos países[35].

Destrucción por reacción autoinmune: Diabetes del tipo I. La causa de la diabetes juvenil es una reacción destructora del sistema inmunitario contra lo propio: las células de los islotes beta del páncreas productoras de insulina. Es obvio que la eficacia de los tratamientos basados en trasplante de islotes de un donante, o la futura implantación de islotes obtenidos a partir de células

troncales, requiere terapias que arreglen y curen la causa de la autodestrucción. La autodestrucción del páncreas se suele producir en edad temprana, por lo que es de esperar que las células de los islotes transplantados, antes o después, volvieran a verse afectadas. Se ha descrito[36] un proceso, que ha dado resultados positivos en animales, consistente en eliminar del páncreas dañado las células del sistema inmunitario autoreactivas, presentes en los islotes, y posterior “reeducación” de linfocitos T normales; los islotes se regeneran espontáneamente a partir de las reservas de células madre del organismo diabético, presentes en los conductos pancreáticos. Teniendo presente la capacidad de regeneración, la investigación debería dirigirse, como aspecto prioritario, en primer lugar a encontrar terapias que potencien directamente en el paciente la proliferación y maduración de sus propias células troncales. De gran importancia, en esta línea, es el descubrimiento de que una hormona natural, la GLP-1, estimula las células troncales del páncreas de adulto a producir y segregar insulina[37]. En efecto, la hormona intestinal GLP-1, no es un simple factor de crecimiento, sino que estimula la neogénesis del páncreas induciendo el crecimiento y la diferenciación de las células progenitoras, que tienen receptor para esta hormona y a su vez son capaces de producirla. El mecanismo de esta nueva génesis de los islotes beta pancreáticos es el mismo que el que tiene lugar durante el desarrollo embrionario. Con ello se podría revertir la diabetes de tipo 1, al reemplazar los islotes pancreáticos destruidos por la enfermedad por los nuevos islotes producidos.

Dos tipos de células del organismo adulto pueden originar células productoras de insulina. Se han transformado células troncales de hígado de ratón en células pancreáticas[38]. Estas células se asocian entre sí en cultivo para formar la estructura tridimensional de los islotes, expresan genes del páncreas, produce las hormonas pancreáticas y segregan insulina. Cuando se implantaron en ratones diabéticos las células transformadas normalizaban la hiperglucemia. Las células hepáticas pueden a su vez derivarse a partir de las células troncales mesenquimatosas de la médula ósea del propio paciente[39].

A su vez las células madre presentes en conductos pancreáticos han podido cultivarse *in vitro* para su maduración hasta células productoras de insulina[40]. En marzo de 2003 se ha publicado que las células troncales de la médula ósea de ratón transformadas y transferidas a otro animal han repoblado *in vivo* los islotes pancreáticos de Langerhans; estas células son productoras de insulina y liberan la hormona de forma dependiente de glucosa[41].

Envejecimiento y autodestrucción prematura de neuronas específicas en la enfermedad de Parkinson. El cerebro contiene células troncales neurales en diferentes zonas con capacidad de diferenciarse a neuronas específicas[42] y las células troncales de la médula ósea son capaces de convertirse en células troncales neuronales[43]. Parece deseable que los procedimientos de Terapia regenerativa se dirijan hacia la restauración directa de las células en el organismo, al menos ante lesiones neuronales en enfermedades degenerativas del sistema nervioso. Es importante poder restaurar las zonas afectadas del cerebro, haciendo proliferar y diferenciar *in situ* las células madre neuronales; o dirigir al cerebro, células troncales de la médula ósea convertidas en neuronales[44].

Diversos experimentos en animales han mostrado que la adición de un factor de crecimiento estimula el crecimiento y migración de las células troncales neuronales[45]. Por ello, la infusión del factor de crecimiento transformante (TGF-alfa) a ratas, con la enfermedad similar a la enfermedad de Parkinson, indujo una proliferación rápida de células madre neuronales, seguida de su migración y diferenciación a neuronas. El 80 por ciento de las ratas se benefició con el tratamiento y en ninguna de las ratas se formaron tumores[46]. Por otra parte, y dado que la extirpación de un cuerpo carotídeo es compatible con una vida completamente normal, los resultados obtenidos en modelos animales de primates[47], permiten sugerir que el autotransplante de cuerpo carotídeo podría ser una técnica útil en el tratamiento de algunos pacientes con la enfermedad de Parkinson. Se necesita aún experimentación animal antes de que sea razonable y ético iniciar en fase clínica terapia celular

en esta enfermedad.

3. Células troncales embrionarias

En el embrión de pocos días existen células que tienen la capacidad de dar origen a cualquier tipo celular embrionario o extraembrionario[48], aunque en el embrión de dos células, tras la primera división del cigoto ambas células contribuyen ya de modo específico al desarrollo posterior. Uno de estos blastómeros está comprometido hacia los tejidos embrionarios (la que hereda la zona de entrada del espermio al óvulo en la fecundación) dando lugar a la masa interna del blastocisto, y el otro a los tejidos extraembrionarios a través de la conversión en trofoblasto[49].

Las células de la masa celular interna (MCI) del blastocisto tienen el potencial de contribuir a cualquier linaje pero no cualquier tipo, y por ello se les denomina *pluripotentes*. Las células del trofoectodermo, por el contrario, sólo contribuyen a dar la capa del trofoblasto de la placenta[50]. Antes de la anidación del embrión las células de la masa celular interna se organizan en dos capas que darán origen al endodermo primitivo, al endodermo extraembrionario, y al epiblasto (la capa de ectodermo primitivo) que dará origen a los tejidos del embrión y a algunos tejidos extraembrionarios[51]. En el embrión en desarrollo estas células son realmente sólo células progenitoras, o precursoras, es decir se multiplican limitadamente antes de diferenciarse y contribuyen con ello a todos los tejidos adultos. Es esa su función.

Sin embargo, cuando las células de la masa celular interna se extraen del ambiente embrionario natural y se cultivan *in vitro*, proliferan sin limitaciones al tiempo que mantienen el potencial de generar células derivadas de cualquiera de los linajes del embrión.

Las líneas celulares pluripotentes (capaces de diferenciarse a las tres láminas embrionarias[52], endodermo, mesodermo y ectodermo, y la línea germinal[53]) derivadas *in vitro* de la masa celular interna se denominan células troncales embrionarias. Después de la anidación, cuando el embrión pasa al estadio de gástrula, las células de la masa interna se han diferenciado y comprometido a linajes específicos, de acuerdo con el tiempo transcurrido y el lugar que ocupan en el organismo embrionario. Son células multipotentes.

Del blastocisto murino se ha aislado otro tipo diferente de células troncales, las del trofoblasto. Usan diferentes vías de señalización que las células troncales embrionarias para mantener la proliferación de su estadio indiferenciado, requieren diferentes factores de diferenciación específicos del estado y contribuyen de forma también diferente al desarrollo de la quimera cuando se inyectan a otro blastocisto. Sin embargo, las células troncales embrionarias pueden transformarse en cultivo en células troncales del trofoblasto[54] precisamente por cambio de la expresión del gen Oct4, que es un factor clave en la determinación de la pluripotencialidad. La expresión de Oct-4 en las células totipotentes de la masa celular interna es muy superior a la detectada en las células diferenciadas del trofoectodermo[55]. A medida que comienzan a aparecer tipos celulares diferenciados en el embrión, los niveles de expresión descienden hasta no ser detectable. Así pues, la expresión de Oct-4 tiene relación con el mantenimiento de la totipotencia de las células de los primeros estadios del desarrollo embrionario regulando la determinación temprana del embrión preimplantatorio

In vivo, la presencia de células embrionarias pluripotentes con capacidad de autorenovación es temporal y transitoria; si las células troncales embrionarias se agregan a un embrión de ocho células, o a un blastocisto, se genera una quimera. Esto indica que las células troncales embrionarias son pluripotentes, pero no totipotentes: a pesar de que contribuyen a todos los tejidos fetales no participan en la formación del trofoectodermo ni del endodermo primitivo[56]. Sin embargo, se

obtienen líneas celulares inmortalizadas manteniendo las propiedades de células troncales por cultivo *in vitro* de las células de la masa interna del blastocisto en presencia de la citoquina denominada factor inhibidor de leucemia (LIF)[57]; estas células troncales embrionarias se mantienen de forma indefinida en presencia del factor LIF, y expresan marcadores del estado indiferenciado pluripotente, como el Oct4. En ausencia de ese factor LIF se reprime rápidamente Oct4 y se pierde la capacidad de regeneración y diferenciación a múltiples tipos celulares.

El proceso de diferenciación de las células de la masa interna del blastocisto es de suyo irreversible; los linajes celulares avanzan en su especialización y maduración pero no vuelven hacia atrás. Se va conociendo con precisión cómo la determinación, el *compromiso* en una dirección, y, con ello, que la diferenciación y especialización celular depende de grupos de genes, asociados entre sí, que controlan cada estadio particular. Genes que se expresan de forma integrada funcionalmente en grupos con diferente nivel de jerarquía. De esta manera, la diferenciación de una célula hacia un estadio de alta especialización se acompaña de una pérdida de la capacidad de multiplicarse, a la vez que la célula guarda memoria de su historia como parte de un organismo y su carácter inherente de célula troncal de reserva, de célula progenitora, de diferenciada, o de célula a término. El balance equilibrado entre la diferenciación y la proliferación se regula genéticamente, y cuando falla constituye la raíz misma de la aparición de un proceso tumoral. Esto implica que las cascadas de expresión de genes que permiten y regulan los tres procesos celulares clave para la vida de un organismo (control de la proliferación, control de la apoptosis y diferenciación) están estrechamente interconectados.

La capacidad de algunas células troncales de multiplicarse y reemplazar a otras puede convertirse en transformación tumoral. Se ha descrito[58] que la proteína nucleostemina es abundante en células con capacidad de proliferación y autoregeneración como las células troncales embrionarias y las células troncales neurales (NSC) y algunas líneas tumorales. Esta proteína descontrola el ciclo celular por enlazarse a las p53. El nivel de la proteína decae drásticamente en las células troncales neurales (NSC) cuando aparece la p53 que marca la terminación del ciclo celular y el inicio de la diferenciación.

No parece razonable un abordaje terapéutico basado en el uso de las células troncales embrionarias. Su potencialidad de crecer se vuelve en descontrol con el riesgo de su transformación en célula tumoral. Su pluripotencialidad fuera de su entorno natural hace difícil el control de su maduración. Queda sólo el interés de su valor potencial como material de partida para aquella investigación que persiga datos y aporte conocimientos beneficiosos para la salud, y que no puedan ser extrapolables de la investigación con animales. Pero ni la necesidad, ni el valor de los conocimientos adquiribles, ni la urgencia de una investigación que beneficie la salud, pueden justificar el uso de embriones vivos (aunque sean crioconservados y excedentes de la fecundación humana asistida) como fuente de la que derivar las células troncales embrionarias. No es ponderable la vida de un ser humano, por incipiente y precaria que sea, con respecto a otro bien.

4. Los criterios biológicos de la individualidad y de la suficiente autonomía vital del embrión preimplantatorio.

Dos peculiaridades del embrión precoz han llevado a algunos a pensar que la vida humana en esa etapa temprana, antes de la implantación, sería insuficiente para poder asumir que posee el carácter personal propio de todo individuo de la especie humana. Una de esas peculiaridades se refiere a la capacidad natural de gemelación monocigótica; para algunos supondría indefinición o carencia de organización individual. Y la otra peculiaridad es la escasa viabilidad natural del embrión preimplantatorio, dada la frecuencia, supuestamente excesiva, de pérdidas espontáneas de embriones precoces. En mi opinión existen datos científicos recientes que iluminan estos aspectos y

me parece que no debemos pasar por alto en este momento.

1. Gemelación e individualidad

Es cierto que no conocemos el mecanismo de la gemelación *in vivo* a partir de una única fecundación. Sin embargo, algunos suponen como único mecanismo la separación de algunas células, que se reagrupan de nuevo para dar una nueva unidad de multiplicación celular, con lo que se generarían dos embriones, que anidarían por separado y originarían dos hermanos gemelos monocigóticos. Según esa visión, esto se debería a la falta de organización unitaria del embrión en su estado preimplantatorio. Pero también se podría aducir que la posibilidad de división no tendría que indicar necesariamente que el embrión carezca de carácter individual; podría suponer sencillamente que una parte de él, por estar en el inicio de la emisión del mensaje, constituyera una nueva unidad de emisión.

De hecho sabemos hoy de manera inequívoca que en el cigoto hay un plano o mapa. Es sorprendente, pero en esa primera célula existe una polarización que obliga a una primera división celular asimétrica, que origina ya en ese momento un eje dorsoventral y otro anteroposterior en ese embrión precoz, preimplantatorio. En efecto, la organización del embrión está creada antes de la implantación[59]. Esto supone un cambio profundo en nuestra idea del embrión. Hace unos años, pocos, unos cinco, como comenta en Nature Helen Pearson[60], quien se hubiera atrevido a afirmar que sólo 24 horas después de la fusión de los gametos existe ya un mapa de destinos en el cigoto, habría corrido el riesgo de ser tildado de ignorante o al menos de hereje científico. Hoy, sin embargo, es difícil dejar a un lado esa afirmación

Gemelación en la fecundación

La fecundación misma puede verse ahora como originaria de la organización individualizada del embrión en la etapa de cigoto. Así, el patrón estructural del blastocisto no se establece si la fecundación no se inició por el camino correcto: así, no lo alcanzan los partenogenotes producidos por una activación del óvulo maduro, ni el embrión derivado de un cigoto al que se le ha quitado el citoplasma cortical de la zona de entrada del espermio[61]. Hay que añadir además que el control del tiempo de la primera y segunda división del cigoto tiene mecanismos muy precisos[62]. La primera división celular de un cigoto tiene dos relojes moleculares, algo que marca claramente su diferencia de la simple división simple de otra célula en dos; son mecanismos mediados por iones, especialmente el calcio[63].

Estos datos permiten plantear un nuevo escenario a la gemelación natural a partir de una única fecundación: un adelanto en el tiempo de la primera división respecto a la organización celular que permite alcanzar el fenotipo cigoto polarizado cuando está terminando el proceso de fecundación. Es decir, una ligera irregularidad en la difusión del ion calcio altera la sincronización de dos procesos habitualmente sincronizados: división celular y organización intracelular polarizada que culmina con la adquisición del fenotipo cigoto. De esta forma, si la célula, producto de la fusión de los gametos, se dividiera antes de haberse polarizado plenamente, las dos células resultantes no son dos blastómeros desiguales que constituyen un embrión bicelular; por el contrario, son dos células iguales derivadas de la célula híbrida, producto de la fusión de los gametos, y capaces de dar lugar a dos cigotos idénticos. Esto es, una sola fecundación daría dos cigotos que se desarrollan independientemente, bajo la misma cubierta (la zona pelúcida del oocito fecundado), y que serán hermanos gemelos, con diferente placenta y amnios. A veces podrían fusionar sus trofoblastos al interaccionar células de este tejido de ambos embriones precoces bajo la misma zona pelúcida y compartir algunos tejidos extraembrionarios, como placenta o incluso cavidad amniótica. En ocasiones la fusión puede hacer que los gemelos compartan incluso tejidos embrionarios, como es

el caso de los siameses[64]. El mecanismo de fusión es más sencillo que el de fisión en el estrecho margen de espacio de la zona pelúcida; sólo así se pueden explicar las quimeras naturales, e incluso las quimeras con hermafroditismo (se deben a la fusión embrionaria de células de un hermano de diferente sexo y procedente de la fecundación de dos óvulos diferente[65]).

La explicación de la gemelaridad por aparición de dos cigotos al completarse la fecundación puede entenderse como una irregularidad “natural” causada por una ligera modificación del flujo de calcio desde la zona de entrada del espermio al óvulo. Ahora bien, también podría ser inducida por factores maternos; precisamente las diversas situaciones en que se da un incremento de la frecuencia de gemelaridad, existe una reducción de los niveles de calcio en la madre en el tiempo de la fecundación[66]. En este caso esa irregularidad natural sería provocada por el estado materno.

Gemelación monocigótica por fisión del embrión preimplantatorio

Generalmente se da por supuesto que la gemelación se origina por una fisión del embrión que se deriva de “decisiones” moleculares que tienen lugar no más tarde del día ocho del desarrollo embrionario[67]. La causa de la gemelación por escisión es un retraso en el desarrollo temporal que refleja una parada bioquímica, y por tanto un enlentecimiento de la vida embrionaria precoz. Se asocia a niveles bajos de calcio en la madre por diversos factores como el bloqueo de los canales de calcio, lactancia (que comporta hipocalcemia), inducción de la ovulación o fecundación *in vitro*. Se ha descrito que el debilitamiento de la fuerza de los enlaces intercelulares pueda facilitar la escisión del embrión; la concentración de calcio en el blastocisto libre es significativamente más baja que cuando interacciona con el endometrio[68], y las proteínas de adhesión son dependientes de calcio. También se ha visto que la gemelación monocigótica es más frecuente en hembras[69], precisamente por el enlentecimiento del desarrollo precoz que conlleva la menor velocidad de replicación de dos cromosomas X respecto a un cromosoma X y otro Y.

Así pues la gemelación por escisión, cuando ocurre, no supone falta de organización intrínseca del embrión sino factores externos que le retrasan el contacto con el endometrio materno. El mantenimiento del embrión en un medio pobre en calcio puede originar debilitamiento de los enlaces intercelulares y deshacer la polarización axial, por lo que las células podrían organizarse en dos ejes de crecimiento.

Gemelación en el inicio de la implantación.

Los estudios de cultivo *in vitro* de blastocistos murinos desprovistos de la zona pelúcida muestran que de cada cien, uno origina gemelos por separación en dos unidades de la masa celular interna al iniciarse el cono de implantación en la zona opuesta al polo embrionario[70]. In vivo, los mismos factores comentados, especialmente la fecundación *in vitro* y cultivo del embrión, llevan consigo un inicio de implantación inespecífica, sin sitio fijo, que aumenta la posibilidad de crecimiento en dos sentidos opuestos de las células de la masa celular interna del blastocisto. De hecho la unión del trofoectodermo del polo embrionario se une al endometrio a través de integrinas específicas que son dependientes de calcio[71]; y requiere una total sincronía con una ventana de tiempo en que la implantación puede ser correcta[72].

4.2. Viabilidad intrínseca

Tres parámetros definen qué morfología se corresponde con el grado de viabilidad intrínseca del blastocisto *in vitro*; y se refieren, como es obvio, a la organización según los ejes diseñados con la polarización del cigoto: a) una cavitación iniciada en el día 4, que origina una cavidad excéntrica; b) la cavidad se expande y se alinea con la región de la masa celular interna delimitada por una capa

de trofoectodermo, y c) la morfología de la masa celular interna presente un único foco. Por el contrario el grado de viabilidad disminuye drásticamente si antes de la expansión se forman vacuolas y más aún si se forman focos degenerativos esta zona[73]. La cantidad de embriones inviables son el resultado de las manipulaciones *in vitro* del proceso y sería extrapolar en falso pensar que reproducen el proceso natural. Por otra parte, las técnicas para un diagnóstico preimplantatorio, que requieren tomar una o dos células de un embrión de tres días, han puesto de manifiesto la asombrosa habilidad para compensar el daño[74].

Sorprende una vez más como la ciencia biológica muestra la realidad y ayuda a acercarse al misterio de la vida.

-
- [1] Rodríguez Alcazar J (1997) Esencialismo y neutralidad científicas. En Ciencia, tecnología y sociedad: contribuciones para una cultura de la paz. Universidad de Granada. Rodríguez Alcázar J, Medina Doménech RM, y Sánchez Cazorla JA (Eds),. <http://www.ugr.es/~eirene>.
- [2] Verfaillie CM, Pera MF, Lansdorp PM (2002) Stem Cells: Hype and Reality. *Hematology*, 369-391.
- [3] Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL (1999) Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* 283, 534-537.
- [4] Clarke D, Frisen J (2001) Differentiation potential of adult stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development* 11, 575-580; Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111; Temple S (2001) The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112-116.
- [5] Jackson KA, Mi T, Goodell MA. (1999) Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14482–14486; Jackson KA, Majka SM, Wang H et al. (2001) Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest* 107, 1395–1402; Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M et al. (2000) Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6, 1229–1234; Krause DS, Theise ND, Collector MI et al. (2001) Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369–377; Galli R, Borello U, Gritti A et al. (2000) Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* 3, 986–991; Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J et al. (2000) Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288, 1660–1663; Zuleswski H, Abraham EJ, Gerlach MJ et al. (2001) Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 50, 521-33.
- [6] Cfr especialmente los trabajos de Catherine M. Verfaillie. Entre otros: Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar D, Koodie L, Verfaillie CM. (2001) Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 98, 2615-2625; Overturf K, Al-Dhalimy M, Tanguay R, et al. (2002) Origin of endothelial progenitors in human post-natal bone marrow. *J Clin Invest*. 109, 337-346.
- [7] Palmieri S, Peter W, Hess H et al. (1994) Oct-4 transcription factor is differentially expressed

in the mouse during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Developmental Biology* 166, 259-267

[8] Abdel-Rahman B, Fiddler M, Rappolee D et al. (1995) Expression of transcription regulating genes in human preimplantation embryos. *Human Reproduction* 10, 2787-2792.

[9] Hansis C, Grifo JAS, Krey LC (2000) Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Molecular Human Reproduction* 6, 999-1004.

[10] Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY et al. (2000) Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. *Nature Biotechnology* 18, 399-404.

[11] Spradling A, Drummond-barbosa D, Kai T (2001) Stem cells find their niche *Nature* 414, 98-104.

[12] Tsai RVL, Kittappa R, McKay RDG (2002) Plasticity, niches, and the use of stem cells. *Develop Cell* 2, 707-712.

[13] Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RE, Schwartz LR, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.

[14] Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar DK, Die L, Verfaillie CM (2001) Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98, 2615-25. Lagasse E, Connors H, Al Dhalimy M et al. (2000) Purified hematopoietic stem cells can differentiate in hepatocytes *in vivo*. *Nat Med* 6, 1229-234.

[15] Ying Qi-Long, Nichol Jennifer N, Evans EP, Smith AG (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 416, 545-547.

[16] Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N y Tada T (2002) Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells. *Curr Biol* 11, 1553-1558.

[17] Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stomaioulo A, Cossu G, Mavilio F (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-1530.

[18] Petersen BE, Bowen WC, Patrene KD, et al. (1999) Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 284, 1168-1170; Alison M, Golding M, Lalani el N, Sarraf C. (1998) Wound healing in the liver with particular reference to stem cells. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 353, 877-894; Alison MR, Poulson R, Jeffery R, et al. (2000) Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406, 257.

[19] Makino S, Fukuda K, Miyoshi S et al (1999) Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 103, 697-705.

[20] Gussoni E, Soneka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flisbnt AF, Kunkel LM, Mulligan RC (1999) Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401, 390-394.

- [21] Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG (2001) Bone marrow stromal stem cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *Stem Cells* 19, 180-192.
- [22] Gazit D, Turgeman G, Kelley P et al. (1999) Engineered pluripotent mesenchymal cells integrate and differentiate in regenerating bone: a novel cell-mediated gene therapy. *J. Gene Med.* 1, 121-133.
- [23] Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA. et al. (1999) Transplantability and therapeutic effects of bone marrow derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfect. *Nat. Med* 5, 309-313.
- [24] Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, et al. (2002) G-CSF induces stem cell mobilisation by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nature Immunology* 3, 687-694.
- [25] Körbling M, Katz RL, Khanna A, et al. (2002) Hepatocytes and epithelial cells of donor origin in recipients of peripheral blood stem cells. *N Engl J Med* 346, 738-746.
- [26] Krause DS, Theise ND, Collector MI, et al. (2001) Multi-organ multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105, 369-77; Alison MR, Poulos R, Jeffery R, et al. (2000) Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406, 257; Theise ND, Nimmakayalu M, Gardner R, et al. (2000) Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 32, 11-16.
- [27] Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. (2001) Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng.* 7, 211-228.
- [28] Safford KM, Hicok KC, Rice H, Safford SD, Halvorsen YDC, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE (2002) Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys. Res. Comm.* 294, 371-379.
- [29] Arthur Z (2002) Liver regeneration: the emergence of new pathways *Med Sci Monit* 8, 53-63.
- [30] Perin, E.C. Geng, Y-J, Willerson JT. (2003) Adult stem cell therapy in perspective. *Circulation* 107, 935-944.
- [31] Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., et al. (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410, 701-705. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. (2000) Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10344-10349; Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, et al. (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 528-530.
- [32] Jackson K, Majka SM, Wang H, et al. (2001) Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* 107, 1395-1402.
- [33] Wang JS, Shum-Tim D, Chedrawy E, Chiu RC (2001) The coronary delivery of marrow stromal cells for myocardial regeneration: pathophysiological and therapeutic implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 122, 699-705.
- [34] Sarm Ch., Westphal, B. Kleine, H.D. et al. (2003) Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. *Lancet* 361, 45-47. Tse, H.F., Kwong, Y.L., Chan J.K.F. et al. (2003) Angiogenesis in ischaemic myocardium by intramyocardial autologous bone

marrow mononuclear cell implantation. *Lancet* 361, 47-49.

[35] Menasche P, Hagege AA, Scorsin M, et al. (2001) Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357, 279-280.

[36] Ryu S, Kodama S, Ryu K, Schoenfeld DA and Faustman DL (2001) Reversal of established autoimmune diabetes by restoration of endogenous beta cell function. *J. Clin. Invest.* 108, 63-72; Faustman DL (2002) Reversal of established autoimmune diabetes by in situ beta-cell regeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 961, 45-47.

[37] Abraham EJ, Leech CA, Lin JC, Zulewski H and Habener JF (2002). Insulinotropic hormone glucagon-like peptide-1 differentiation of human pancreatic islet-derived progenitor cells into insulin-producing cells. *Endocrinology* 143, 3152-3161.

[38] Yang L, Li S, Hatch H, Ahrens K, Cornelius JG, Petersen BE, Peck AB (2002). In vitro trans-differentiation of adult hepatic stem cells into pancreatic endocrine hormone-producing cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 99, 8078-83.

[39] Schwartz RE, Reyes M, Koodie L, Jiang Y, Blackstad M, Lund T, Lenvik T, Johnson S, Hu WS, Verfaillie CM (2002). Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.* 109, 1291-1302.

[40] Ramiya VK, Maraist M, Arfors KE, Schatz DA, Peck AB, Cornelius JG (2000). Reversal of insulin-dependent diabetes using islet generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nature Medicine* 6, 278-282; Zulewski H, Abraham EJ, Gerlach MJ, Daniel PB, Mortz W, Muller B, Vallejo M, Thomas MK and Habener JF (2001). Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islet differentiated ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 50, 521-533; Bonner-Weir S. and Sharma A (2002) Pancreatic stem cells. *J. Pathol.* 197, 519-526.

[41] Ianus A, Holz GG, Theise N D, Hussain MA (2003) In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J. Clin. Invest.* 111, 843-850; Lee VM and Stoffel M. (2003) Bone marrow: An extra-pancreatic hideout for the elusive pancreatic stem cell? *J. Clin. Invest.* 111, 799-801.

[42] Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J, et al. (2000) Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288, 1660-1663.

[43] Sanchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol.* 164, 247-256.

[44] Mezey E, Chandross KJ, Harta G et al. (2000) Turning blood into brain: Cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* 290, 1779-1782; Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res.* 15, 364-370.

[45] Tuszynski MH (2000) Intraparenchymal NGF infusions rescue degenerating cholinergic neurons. *Cell Transplant* 9, 629-636; Kondo T, Raff M (2000) Oligodendrocyte precursor cells reprogrammed to become multipotent CNS stem cells. *Science* 289, 1754-1757.

[46] Fallon J et al. (2000) In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and

differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 14686-14691.

[47] Luquin R, et al. and López-Barneo J. (1999) Recovery of chronic parkinsonism monkeys by autotransplants of carotid body cell aggregates. *Neuron* 22, 743-7550.

[48] Thomson JA, Odorico JS (2000) Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Trends in Biotechnology* 18, 53-57.

[49] Piotrowska K, Wianny F, Pedersen RA, Zernicka-Goetz M (2001) Blastomeres arising from the first cleavage division have distinguishable fates in normal mouse development. *Development* 128, 3739-3748; Winkel GK, Pedersen RA (1988) Fate of the inner cell mass in mouse embryos as studied by microinjection of lineage tracers. *Developmental Biology* 127, 143-156; Piotrowska K, Zernicka-Goetz M (2001) Role for sperm in spatial patterning on the early mouse embryo. *Nature* 409, 517-521; Gardner RL (2001) Specification of embryonic axes begins before cleavage in normal mouse development. *Development* 128, 839-847.

[50] Rossant J. (1995) Development of the extraembryonic lineages. *Semin Cell Dev Biol* 6, 237-247.

[51] Gardner RL (1982) Investigation of cell lineage and differentiation in the extraembryonic endoderm of the mouse embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 68, 175-198.

[52] Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, Soreq H, Benvenisty (2000) Embryoid Bodies (EBs) studies. *Mol Med* 6, 88-95.

[53] Desbaillets I, Ziegler U, Groscurth P, Gassmann M (2000) Embryoid bodies: an in vitro model of mouse embryogenesis. *Exp Physiol* 85, 645-651.

[54] Rossant J (2001) Stem cells from the Mammalian blastocyst *Stem Cells* 19,477-82.

[55] Hansis C, Grifo JAS, Krey LC (2000) Oct-4 expression in inner cell mass and trophectoderm of human blastocysts. *Molecular Human Reproduction* 6, 999-1004.

[56] Beddington RSP, Robertson EJ (1989) An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development* 105, 733-737; Nagy A, Gocza E, Diaz EM et al. (1990) Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development* 110, 815-822.

[57] Smith AG, Heath JK, Donaldson DD et al. (1988) Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified peptides. *Nature* 336, 688-690; Williams RL, Hilton DJ, Pease S et al. (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687.

[58] Tsai RYL, McKay RDE. (2002). A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes & Development* 16, 2991-3003.

[59] Zernicka-Goetz M. (2002) Patterning of the embryo: the first spatial decisions in the life of a mouse. *Development* 129, 815-829. Gardner RL (2001) The initial phase of embryonic patterning in mammals *Internat Rev Cytol* 203, 233-290.

- [60] Helen Pearson. (2002) Your destiny from day one. *Nature* 418, 14-15.
- [61] Piotrowska K, Zernica-Goetz M. (2002) Early patterning of the mouse embryo-contributions of sperm and egg. *Development* 129, 5803-5813.
- [62] Ciemerych MA, Maro B, Kubiak JZ. (1999) Control of duration of the first two mitoses in a mouse embryo. *Zygote* 7, 293-300.
- [63] Day ML, Johnson MH, Cook DI. (1998) Cell cycle regulation of a T-type calcium current in early mouse embryos. *Eur. J. Physiol.* 436, 834-842.
- [64] Spencer R. (1992) Conjoined twin theoretical embryologic basis. *Teratology* 45, 591-602.
- [65] Strain L, Dean JCS, Hamilton MPR, Bonthron DT (1998) A true hermaphrodite chimera resulting from embryo amalgamation after in vitro fertilization. *New England Journal of Medicine* 338, 166-169.
- [66] Steinman G. (2001) Mechanisms of Twinning III. Placentation, Calcium Reduction and Modified Compaction *The Journal of Reproductive Medicine* 46, 995-1002; Boklage CE (1987) Twinning, nonright-handedness, and fusion malformations: Evidence for heritable causal elements held in common. *Am J Med Genet* 28, 67-84.
- [67] Cfr. revisión: Steinman G. (2001) Mechanisms of Twinning Medicine II. Laterality and Intercellular Bonding in Monozygotic Twinning. *The Journal of Reproductive Medicine* 46, 473-479.
- [68] Lutwak-Mann C, McIntosh JEA (1971) Calcium content and uptake of Ca in rabbit blastocysts and their environment. *J Reprod Fertil* 27, 471-475.
- [69] James WH (1980) Sex ratio and placentation in twins. *Ann Hum Biol* 7, 273-276; Steinman (2001) Mechanisms of Twinning IV. Sex Preference and Lactation. *The journal of Reproductive Medicine* 46, 1003-1007.
- [70] Hsu YC, Gonda MA (1980) Monozygotic Twin Formation in mouse embryos in vitro. *Science* 209, 605-606
- [71] Frenette PS, Wagner DD (1996) Adhesion molecules: Part I. *N Engl J Med* 334, 1526-1529.
- [72] Genbaced OD et al. (2002) Trophoblast L-selectin mediated adhesion at the maternal – fetal interface. *Science* 299, 405-408.
- [73] Balaban B et al. (2000) Blastocyst quality affects the success of blastocyst-stage embryo transfer. *Fertility and Sterility* 74, 282-287.
- [74] Harper JC, Delhanty JDA, Handyside A (2001) *Preimplantation Genetic Diagnosis*, Wiley, New York.