
Trasplante celular y terapia regenerativa con células madre

Cell transplant and regenerative therapy with stem cells

F. Prósper¹, J. J. Gavira², J. Herreros², G. Rábago², R. Luquin³, J. Moreno⁴, J. E. Robles⁵, P. Redondo⁶

RESUMEN

Uno de los campos de la medicina que más expectativas ha levantado en los últimos años es la terapia celular con células madre. El aislamiento de células embrionarias humanas, la aparente e inesperada potencialidad de las células madre adultas y el desarrollo de la terapia génica nos lleva a imaginar un futuro esperanzador para un importante número de enfermedades actualmente incurables. A lo largo de las siguientes páginas vamos a tratar de dibujar el panorama de la investigación con células madre, describiendo los principales logros en este campo así como algunas de las preguntas pendientes de responder. A pesar de las grandes expectativas, es fundamental que mantengamos un espíritu crítico y realista a la hora de analizar los avances científicos en este área.

Palabras clave. Células madre. Terapia celular. Transdiferenciación.

ABSTRACT

One of the fields of medicine that has raised the most expectations in recent years is cell therapy with stem cells. The isolation of human embryo cells, the apparent and unexpected potentiality of adult stem cells and the development of gene therapy lead us to imagine a hopeful future for a significant number of diseases that are at present incurable. In this article we will sketch out the panorama of stem cell research, describing the main achievements in this field as well as some of the questions that await an answer. In spite of the great expectations, it is essential that we maintain a critical and realistic spirit when it comes to analysing the scientific advances in this area.

Key words. Stem cells. Cell therapy. Transdifferentiation.

An. Sist. Sanit. Navar. 2006; 29 (Supl. 2): 219-234.

-
1. Servicio de Hematología y Area de Terapia Celular. Clínica Universitaria. Pamplona.
 2. Departamento de Cardiología y Cirugía Cardiovascular. Clínica Universitaria. Pamplona.
 3. Servicio de Neurología. Clínica Universitaria. Pamplona.
 4. Departamento de Oftalmología. Clínica Universitaria. Pamplona.
 5. Departamento de Urología. Clínica Universitaria. Pamplona.
 6. Departamento de Dermatología. Clínica Universitaria. Pamplona.

Correspondencia:

Felipe Prósper
Servicio de Hematología y
Area de Terapia Celular
Clínica Universitaria
Avda. Pío XII 36
31008 Pamplona
Tfno. 948 25 54 00

INTRODUCCIÓN

Las primeras evidencias científicas de que en el organismo adulto existen células madres proviene de experimentos realizados por Till y McCulloch a finales de los años 50, centrados en las células madre hematopoyéticas. Sin embargo, la capacidad de regenerar tejidos en organismos adultos, e incluso de regenerar organismos completos, como en el caso de planarias, se conoce desde mucho antes. Clínicamente, hemos explotado la potencialidad de las células madre adultas, concretamente de las células madre hematopoyéticas, desde hace más de 50 años, y podemos afirmar que gracias al trasplante de médula ósea (trasplante de células madre hematopoyéticas), miles de pacientes han podido ser curados de enfermedades incurables de otra forma. Aunque la forma más ampliamente utilizada de terapia celular (TC) es el trasplante de progenitores hematopoyéticos, el término TC, en un sentido amplio incluye cualquier tipo de tratamiento que utiliza células como agente terapéutico.

El interés por la utilización de las células madre, sin embargo, ha crecido de forma exponencial en los últimos años a raíz de la identificación, caracterización y aislamiento de las células madre embrionarias humanas¹ y de las expectativas, de alguna forma prematuras, de que las células madre podrían ser capaces de curar innumerables enfermedades (enfermedades neurodegenerativas, cardíacas, endocrinológicas, etc.) gracias a su enorme potencial de diferenciación. Desgraciadamente, el debate científico sobre las aplicaciones terapéuticas de las células madre, adultas o embrionarias, se ha transformado en un debate político y mediático en detrimento del ambiente necesario que facilite el progreso científico.

A lo largo de este artículo nos vamos a centrar en discutir algunos aspectos sobre las células madre adultas, sus orígenes en el organismo y sus posibles aplicaciones, actuales y futuras. Antes de continuar, queremos hacer tres comentarios: por razones obvias, en esta revisión no podemos ser comprehensivos, por lo cual pedimos disculpas al lector y a aquellos autores cuyos trabajos omitimos por limitaciones de espacio;

en segundo lugar, debido al enorme impulso que esta área de la biomedicina tiene en la actualidad, con seguridad, algunos de los conceptos y afirmaciones que hagamos en estas páginas habrán quedado obsoletas en el momento de su publicación, por lo que nos gustaría que este capítulo sirviera más de guía para aquellas personas interesadas en iniciarse en el campo de las células madre; finalmente y quizá sea el mensaje más importante que queremos transmitir, a pesar de las enormes perspectivas que existen en relación con las células madre, es esencial que seamos capaces de transmitir un sentimiento de prudencia y paciencia a nuestros enfermos y colegas: las células madre pueden llegar a contribuir al tratamiento de distintas enfermedades, pero estos avances no son a corto plazo. Solamente la investigación seria y continuada, podrá contribuir a medio o largo plazo a determinar la utilidad terapéutica real de las células madre adultas o embrionarias.

CÉLULAS MADRE

Una célula madre o más adecuadamente denominada troncal, es aquella que es capaz de dividirse indefinidamente y diferenciarse a distintos tipos de células especializadas, no sólo morfológicamente sino también de forma funcional. Las células madre se pueden clasificar según su capacidad de diferenciarse a distintos tipos de tejidos o lo que es lo mismo según su potencialidad: las células madre totipotenciales son aquellas capaces de producir tanto tejido embrionario, es decir un embrión completo como extraembrionario (placenta y anejos placentarios). En sentido estricto solamente los estadios iniciales del cigoto constituirían células madre totipotenciales; las células madre pluripotenciales son aquellas que tienen la capacidad de diferenciarse a cualquiera de los tejidos existentes en un organismo adulto y por tanto tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias, incluyendo las células germinales; por último, las células madre multipotenciales serían capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares, pero siempre restringiendo su potencial a tejidos derivados de una única capa embrionaria, es decir tejidos derivados mesodérmicos, ectodérmicos o endodérmicos².

Desde el punto de vista de su origen dividimos a las células troncales en embrionarias (derivan del embrión, bien del blastocisto o de la cresta gonadal) y adultas (derivan de alguno de los tejidos adultos). Aunque no vamos a entrar en aspectos éticos relacionados con la utilización de células madre embrionarias humanas, sí que es interesante hacer algunos comentarios sobre la biología y potencialidad de ambos tipos de células madre.

Además de las células madre, existen las denominadas células progenitoras o precursoras (hay autores que distinguen células progenitoras y células precursoras pero con el espíritu de simplificar un área ya de por sí compleja, consideraremos sinónimos estos dos términos) que serían aquellas células comprometidas a un determinado linaje pero con cierta capacidad proliferativa (también se han denominado células TAC o "transient amplifying cells"). Las diferencias entre las células madre y las células precursoras en ocasiones no son claras.

Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias se han obtenido bien a partir de la masa celular interna del blastocisto en el estadio de embrión preimplantatorio¹ o bien de la cresta gonadal³. Aunque las líneas de células embrionarias de ratón se utilizan desde hace más de 20 años⁴, hasta 1998 no fue posible obtener células embrionarias humanas^{1,3}. La posibilidad de obtener y utilizar terapéuticamente las células embrionarias humanas ha disparado, a nuestro juicio de forma desproporcionada, las expectativas de la terapia celular con células madre.

Las células madre embrionarias son pluripotenciales, es decir son capaces de proliferar de forma continua sin diferenciarse, siendo prácticamente inmortales, y además son capaces de diferenciarse a cualquier tejido del organismo, incluyendo tejidos somáticos (corazón, hígado, hueso, pulmón, cerebro, etc... y células germinales (oocitos y espermatozoides) como se ha podido demostrar recientemente⁵⁻⁸. Obviamente, la posibilidad de obtener cualquier tipo de tejido y sin limitaciones

en cuanto a número de células ha abierto expectativas de tratamiento de enfermedades tradicionalmente incurables (infarto de miocardio, enfermedades neurodegenerativas, enfermedad de Parkinson, diabetes y otras muchas).

Sin embargo, las células madre embrionarias tienen, a día de hoy, importantes limitaciones que de momento han hecho que no exista ningún estudio clínico abierto en pacientes. Por una parte, la misma capacidad proliferativa de estas células lleva a que en los distintos modelos animales en los que se han utilizado, se detecte de forma invariable la producción de tumores (teratomas y teratocarcinomas). Junto a este problema no despreciable, se encuentra el hecho de que en el trasplante de células embrionarias se produciría entre dos sujetos inmunológicamente incompatibles, lo cual exigiría la utilización de medicación inmunosupresora y los consiguientes efectos adversos. Aunque en este sentido, la clonación terapéutica al menos teóricamente, permitiría eludir el problema de histoincompatibilidad, desde el punto de vista económico e incluso científico no es una solución viable hoy en día.

Células madre adultas

Se conoce desde hace muchos años que distintos tejidos del organismo tienen la capacidad de auto-regenerarse, gracias a la existencia de células madre residentes en dichos tejidos. Estas células madre obtenidas de tejidos adultos, poseen las dos características de auto-renovación y diferenciación que hemos mencionado anteriormente. Sin embargo, a diferencia de las células madre embrionarias, se considera que su capacidad proliferativa y su potencial de diferenciación es significativamente menor⁹. Se han identificado células madre adultas en la médula ósea, músculo esquelético, epidermis, intestino, testículo, hígado, y de forma más reciente en tejidos como el sistema nervioso central o el corazón.

Las células madre adultas se consideran multipotenciales, es decir capaces de diferenciarse a un número limitado de tejidos, principalmente en función de su origen embrionario (células de origen meso-

dérmico pueden diferenciarse a tejidos derivados mesodérmicos etc.). Sin embargo, cada vez parece más evidente que las células madre adultas son capaces de generar células maduras de tejidos derivados de capas embrionarias distintas, siendo el caso más típico el de las células madre hematopoyéticas capaces de diferenciarse a hepatocitos, músculo cardíaco, endotelio o incluso a tejidos derivados de las tres capas embrionarias⁹⁻¹². Este fenómeno, denominado versatilidad o capacidad de transdiferenciación de las células madre adultas, no está exento de controversia, ya que mientras algunos estudios lo apoyan, otros trabajos recientes cuestionan la existencia de esta capacidad de transdiferenciación de las células, justificando algunos de los hallazgos de versatilidad en función de fenómenos de fusión celular^{13,14} o incluso, cuestionando abiertamente los resultados experimentales¹⁵.

TERAPIA CELULAR CON CÉLULAS MADRE

A día de hoy las aplicaciones clínicas de la terapia celular se limitan a las células madre adultas por lo que de forma fundamental nos limitaremos a este tipo de células. Es posible que en el futuro las células madre embrionarias se apliquen de forma terapéutica, pero hoy en día las limitaciones que hemos mencionado anteriormente, hacen inviable su utilización. Existen ensayos clínicos con células madre embrionarias previstos en un futuro próximo y dirigidos por una compañía de biotecnología que posee la patente de todas las líneas celulares embrionarias producidas hasta el momento.

Las aplicaciones de las células madre las podemos dividir en dos grupos principales: en primer lugar, su potencial de diferenciación permitiría utilizarlas para regenerar tejidos destruidos o dañados, como es el caso de enfermedades neurodegenerativas, diabetes o patología cardíaca; en segundo lugar, las células madre podrían ser empleadas como vehículo terapéutico de genes, como en el caso de enfermedades monogénicas así la hemofilia o incluso como vehículo de terapias antitumorales o antiangiogénicas. Nuevamente por cues-

tiones de espacio, describiremos algunas de las potenciales aplicaciones de las células madre en terapia regenerativa.

Terapia celular en endocrinología

La prevalencia de la diabetes mellitus se está incrementando hasta adquirir proporciones epidémicas en el mundo. Se estima que actualmente 100 millones de personas padecen la enfermedad, debido a la incapacidad de las células β del páncreas de secretar insulina, hormona fundamental para el control de la glucemia. En la actualidad no existe un tratamiento curativo de la diabetes sino que el pronóstico de los pacientes esta supeditado al control de su glucemia mediante el tratamiento sustitutivo.

Recientemente, los resultados positivos obtenidos mediante el trasplante de islotes de páncreas en pacientes diabéticos ha incrementado el interés por utilizar células capaces de producir insulina. Mientras que el escaso número de islotes y la imposibilidad de expandir dichas células *in vitro*, impide que el trasplante de islotes de cadáver sea utilizable en un número importante de pacientes, la posibilidad de utilizar células madre con capacidad de diferenciarse en células productoras de insulina se plantearía como una estrategia mucho más atractiva¹⁶.

En modelos experimentales se ha podido demostrar que las células madre embrionarias se pueden diferenciar a células secretoras de insulina y que cuando estas células se implantan en el bazo de ratones, en los que previamente se ha inducido una diabetes mediante la inyección de estreptozotocina, son capaces de inducir una normalización de las cifras de glucosa. Uno de los principales problemas para la utilización de células embrionarias es que en el proceso de diferenciación, además de células productoras de insulina, se producen otros tipos celulares diferentes, que habría que eliminar de forma previa a su utilización¹⁷.

Aunque hasta el momento no ha sido posible caracterizar la célula madre pancreática, distintos estudios sugieren el potencial de células obtenidas a partir de hígado, conductos pancreáticos o islotes pancreáticos o incluso células de médula

ósea para producir células secretoras de insulina^{18,19}. En cualquier caso, una de las principales limitaciones con cualquiera de los tipos celulares descritos es que el porcentaje de células secretoras de insulina que se pueden obtener es muy pequeño, lo cual limita su aplicación terapéutica. A pesar del enorme interés en esta área de investigación, no existe ningún estudio clínico publicado utilizando células madre en pacientes con diabetes tipo I aunque las expectativas sean enormes.

Terapia celular en enfermedades neurológicas

Las células madre tienen un enorme potencial como células capaces de reconstruir las neuronas y estructuras dañadas en enfermedades como la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Alzheimer, esclerosis en placas, infartos cerebrales o las lesiones medulares por mencionar algunas. El sistema nervioso central añade una dificultad adicional a la terapia celular. Al ser un órgano con una sofisticada organización estructural, las células implantadas han de ser capaces no solo de injertarse, sino asimismo de establecer nuevas conexiones sinápticas e integrarse con el resto del tejido circundante.

La enfermedad de Parkinson (EP) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a más del 2% de la población mayor de 65 años. Se caracteriza por una degeneración progresiva de las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra²⁰ que origina la aparición de los signos y síntomas característicos de la enfermedad. A pesar del tratamiento farmacológico, la evolución de la enfermedad conlleva complicaciones motoras y psiquiátricas que disminuyen la calidad de vida de los pacientes y dificultan su manejo clínico. La utilización de células con capacidad de sintetizar y liberar dopamina y restablecer los circuitos neuronales dañados se perfilan como nuevas expectativas en el tratamiento de la EP²¹. En la EP se han utilizado células de origen fetal en ensayos clínicos en humanos con resultados cuando menos controvertidos^{22,23}. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que tanto las células madre

embrionarias como las adultas (células madre de médula ósea, células madre neurales) son capaces de diferenciarse a neuronas dopaminérgicas. Sin embargo, no está claro hasta qué punto dichas células son capaces de restablecer los circuitos neuronales destruidos en la EP y por tanto eliminar los síntomas de la enfermedad.

Las lesiones medulares, principalmente secundarias a traumatismos, son una de las causas más frecuentes de patología neurológica en edades jóvenes. No existe un tratamiento curativo para esta enfermedad incapacitante, por lo que la posibilidad de utilizar células madre para restablecer las conexiones axonales aparece como una estrategia especialmente atractiva. Estudios recientes sugieren que las células madre embrionarias poseen la capacidad de diferenciarse a neuronas motoras y facilitar la recuperación motora en animales con lesiones espinales^{24,25}. Sin embargo, parece que el mecanismo por el cual dichas células contribuyen a restablecer las neuronas motoras estaría relacionado con la liberación de factores de crecimiento que contribuirían al recrecimiento de los axones destruidos. Otros tipos celulares, como las células de la glía envolvente o las células mesenquimales (o estromales) de la médula ósea también han demostrado su capacidad para favorecer el recrecimiento de los axones tal como se ha demostrado en modelos animales²⁶⁻²⁸.

La esclerosis múltiple es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la degeneración de las células productoras de mielina (oligodendrocitos) y que se manifiesta por una afectación motora y sensitiva como consecuencia de la desmielinización de los axones. La posibilidad de favorecer la formación de mielina mediante la utilización de células madre capaces de diferenciarse a oligodendrocitos ha sido explorada en modelos animales. Un estudio reciente, ha podido demostrar en un modelo de esclerosis múltiple en ratón (más concretamente de encefalitis autoinmune experimental), que la inyección de neuroesferas (células madre neurales), tanto de forma intravenosa como intratecal, promueve la remielinización multifocal. Indudablemente, estos resultados están muy lejos de justificar experimentos

en pacientes, en una enfermedad, que aunque incapacitante, tiene una supervivencia prolongada²⁹.

Por la gran incidencia y el elevado coste económico y humano que generan, los accidentes cerebrovasculares son uno de los objetivos más atractivos para la terapia celular. Las evidencias recientes que indican la presencia de un proceso de neurogénesis tras producirse una isquemia cerebral han estimulado el interés por utilizar células madre para suplementar la regeneración autóloga que se produce espontáneamente^{30,31}. El beneficio de la terapia celular con células madres podría deberse al aporte exógeno de células con capacidad de neurogénesis o de angiogénesis, o debido a la modulación del microambiente, estimulando la supervivencia y diferenciación de las células residentes en el tejido dañado. El trasplante de células madre neurales en modelos de rata ha demostrado ciertos beneficios y de hecho se han realizado pequeños estudios en humanos utilizando neuronas obtenidas a partir de una línea celular de teratocarcinoma^{32,34}. Estudios realizados en animales sugieren que las células de médula ósea son reclutadas a las zonas de infarto cerebral y que contribuyen a la mejoría funcional cuando son inyectadas focalmente e incluso intravenosamente. La inyección de células se asocia con la formación de nuevos vasos, liberación de factores tróficos así como con la expresión de marcadores neurales por parte de las células implantadas.

No son éstas las únicas enfermedades neurológicas susceptibles de beneficiarse de la terapia celular con células madre pero sí las más frecuentes o las que representan un paradigma, como es el caso de la enfermedad de Parkinson.

Terapia celular en enfermedades cardiovasculares

La cardiopatía isquémica es una de las causas más importantes de mortalidad y morbilidad en el mundo occidental y un problema de salud pública. Dentro de ésta, el infarto de miocardio tiene una especial trascendencia ya que el músculo cardíaco posee una limitada capacidad de regenerarse, por lo que la necrosis de una región

lleva a la formación de una cicatriz fibrosa. Dependiendo del área a la que afecte esta cicatriz, y debido a los mecanismos que condicionan el remodelado ventricular, el infarto puede llevar a una disminución progresiva e irreversible de la función cardíaca que conduce al síndrome de la insuficiencia cardíaca (IC). La prevalencia de la IC en la población general en EEUU o el Reino Unido es del orden del 1% y en los mayores de 75 años oscila entre el 5 y 10%³⁵. En los últimos años se han desarrollado nuevos tratamientos para la fase aguda del infarto de miocardio (fibrinólisis, angioplastia primaria) que han tenido un gran impacto en el pronóstico de estos pacientes pero, que desgraciadamente no han conseguido detener la evolución de la enfermedad que prosigue hasta el desarrollo de la IC terminal. Para su tratamiento el único recurso real del que disponemos en la práctica clínica es el trasplante cardíaco, cuyas limitaciones más importantes son la desproporción entre el número de donantes y receptores potenciales, así como la necesidad de tratamiento inmunosupresor de por vida.

La posibilidad de utilizar células madre para regenerar el músculo cardíaco destruido ha abierto enormes esperanzas para un número muy importante de pacientes. Es probablemente en este campo donde la experiencia clínica es mayor, habiéndose publicado en la actualidad más de 20 ensayos clínicos de terapia celular en pacientes con infarto de miocardio. Por limitaciones de espacio nos limitaremos a detallar los tipos de células empleadas y algunos aspectos concretos de los resultados obtenidos (se han publicado excelentes revisiones recientes en este sentido)³⁶⁻⁴⁰.

Diversos estudios, inicialmente en modelos experimentales y posteriormente en humanos, han utilizado las células madre del músculo para regenerar el músculo cardíaco en pacientes con infarto de miocardio (mioblastos esqueléticos)⁴¹. La plasticidad de las células de músculo esquelético junto con su capacidad de responder a estímulos eléctricos sugieren la posibilidad de que células musculares individuales (mioblastos) puedan ser convertidos en fibras musculares capaces de pro-

ducir trabajo cardíaco (cardiomioplastia celular)⁴². Los estudios iniciales con mioblastos obtenidos de músculo esquelético han permitido determinar que dichas células son capaces de injertar en el corazón de animales de experimentación y contribuir a mejorar la función contráctil del corazón⁴³ constituyendo la base de la aplicación de esta técnica en pacientes con infarto de miocardio.

El grupo de Menasche ha sido pionero en la utilización de mioblastos esqueléticos, realizando el primer implante de mioblastos autólogos en un paciente con un IM en junio de 2.000⁴⁴. La estrategia diseñada por este grupo y posteriormente utilizada por otros grupos, consiste en la obtención de una biopsia muscular del propio paciente entre las 2-3 semanas previas a la cirugía de revascularización en pacientes con IM antiguo. Durante la cirugía se procede al implante por inyección intramiocárdica de las células cultivadas *in vitro* en la región peri-infarto. Los estudios realizados por el grupo de Menasche y por nuestro grupo han permitido demostrar la seguridad del procedimiento y su eficacia^{45,46}. Otros grupos, de forma muy reciente, han utilizado una vía de administración percutánea, evitando por tanto la necesidad de la cirugía⁴⁷. Tanto los estudios en modelos experimentales como los estudios clínicos indican la capacidad de los mioblastos para implantarse y diferenciarse a células musculares esqueléticas. Sin embargo, no se ha podido demostrar que las células originadas a partir de los mioblastos sean capaces de transmitir las señales electromecánicas derivadas de las células musculares cardíacas o de transdiferenciarse a células musculares cardíacas.

Estudios recientes apoyan la existencia de diferentes poblaciones celulares en la médula ósea (MO) con capacidad de diferenciarse a fibras musculares cardíacas, así como a células endoteliales, contribuyendo a la angiogénesis o vasculogénesis⁴⁸⁻⁵³. En la mayoría de estos estudios, los investigadores han utilizado poblaciones celulares heterogéneas, lo que limita de forma importante las conclusiones, ya que no es posible determinar cuáles son exactamente las células responsables del beneficio terapéutico. Frente a estudios en los

que se han utilizado células mononucleadas de MO⁴⁸, el grupo de Anversa y Orlic han utilizado poblaciones seleccionadas de células madre hematopoyéticas de MO (Lin- Kit+), demostrando la capacidad de dicha células de injertarse, diferenciarse a células musculares cardíacas y endoteliales, y contribuir a la mejora de la función cardíaca.

Además de las células madre hematopoyéticas, en la médula ósea existen progenitores y células madre angioblásticas, identificables por la presencia de una serie de marcadores y antígenos celulares como CD34, AC133 o el receptor de VEGF tipo 2, expresados a su vez en células madre hematopoyéticas^{53,57}. Estudios realizados en modelos animales de isquemia periférica e IM indican que en la MO existen células madre endoteliales con capacidad de contribuir a la neoangiogénesis, favoreciendo la regeneración miocárdica^{49,53,58,59}. Estas células madre endoteliales pueden ser movilizadas a sangre periférica y contribuir también a la angiogénesis en extremidades isquémicas⁵⁹.

Las células madre mesenquimales (MSC) son capaces de diferenciarse a tejidos mesodérmicos como osteoblastos, condrocitos, adipocitos o músculo esquelético⁶⁰, pero a su vez, estudios recientes indican que las MSC son capaces de diferenciarse tanto *in vitro* como *in vivo* a cardiomiocitos^{48,61}. *In vitro*, el cultivo de MSC en presencia del agente desmetilante 5-azacitidina induce diferenciación hacia células con características fenotípicas y electrofisiológicas de músculo cardíaco⁶². Utilizando modelos animales de IM, varios grupos han demostrado que las células madre mesenquimales inyectadas en la cicatriz miocárdica no sólo son capaces de injertarse, sino que adquieren características de cardiomiocitos y, lo que es más importante, contribuyen a mejorar la función cardíaca^{48,63}.

A pesar del número de incógnitas existentes, la acumulación de resultados derivados de los estudios preclínicos en los últimos 5 años ha impulsado el desarrollo de los primeros ensayos clínicos de factibilidad y seguridad de regeneración cardíaca con células madre. Tales ensayos hasta el

momento no han estado desprovistos de cierto grado de controversia, derivado de la opinión de distintos investigadores cuyo argumento es la falta de suficientes evidencias que apoyen el inicio de la investigación clínica. No vamos a detenernos en argumentar las distintas posturas, sino en poner en perspectiva los esfuerzos clínicos realizados. Hasta el momento se han publicado al menos 20 estudios clínicos en los que se han utilizado las vías percutánea, intracavitaria o intramioecárdica; se han implantado células mononucleadas de médula ósea, células enriquecidas en progenitores hematopoyéticos o endoteliales o mioblastos y los resultados se han monitorizado mediante técnicas de imagen y función como resonancia, ecocardiografía o tomografía con positrones. Algunos estudios han utilizado pacientes controles con los que comparar los resultados entre los pacientes que han recibido células y los que no, pero en cualquier caso todos los pacientes han recibido además de las células tratamientos adicionales. La acumulación de estos resultados apoyan la continuidad de los estudios en marcha y el desarrollo de nuevos ensayos clínicos.

Terapia celular en oftalmología

La visión junto con los otros sentidos provee la relación con el mundo exterior, y es de gran valor para la supervivencia de muchas especies animales y tiene un gran valor para los hombres. A pesar de su importancia sólo en algunas especies de anfibios se conserva una capacidad de regeneración importante de los tejidos del ojo. Es por tanto, de gran valor conocer en profundidad los distintos tipos de células madre del ojo y sus mecanismos de renovación y regeneración, para intentar terapias capaces de recuperar los distintos tejidos oculares que se pueden dañar. Las estructuras que tienen más interés desde el punto de vista de la medicina regenerativa son el epitelio corneal, el epitelio conjuntival y la retina.

La fuente de células del epitelio corneal son las células madre que se encuentran en la región del limbo corneal. Estas células, que se encuentran en la zona de transición entre la córnea y la esclera, tienen todas las características de las células madre, ya que poseen una gran capacidad de renovación, que se mantiene a lo largo

de la vida y son capaces de originar células hijas que pueden sufrir un proceso de diferenciación terminal a células especializadas⁶⁴. Sin embargo, no se ha podido demostrarse que estas células sean pluripotentes y parece que sólo dan lugar a células del epitelio corneal y conjuntival. Actualmente no existe un marcador biológico definitivo de las células madre del limbo corneal, aunque se han propuesto varios, como la alfa-enolasa, y más recientemente, el factor de transcripción p63 aunque ciertamente estos antígenos puede aparecer en otras células⁶⁵.

En condiciones fisiológicas, las células madre del limbo corneal son capaces de suplir la necesidad de renovación de la córnea. Sin embargo, en algunas situaciones patológicas, como traumatismos, quemaduras, sustancias químicas, síndrome de Stevens Johnson o penfigoide ocular, la capacidad de regeneración de las células limbocorneales se ve desbordada (o se produce una disminución o ausencia de éstas) y se origina un daño corneal permanente⁶⁶. Aunque el trasplante de córnea es una opción, no es eficaz en los casos donde es necesario restaurar el epitelio corneal. Kenyon y Tseng en 1989 fueron los primeros en llevar a cabo un autotrasplante de limbo conjuntival⁶⁷. Posteriormente, tras el conocimiento de las células madre corneales, Kinoshita modificó la técnica para transplantar células madre del limbo corneal en conejos.

Actualmente el trasplante de limbo corneal es una práctica reconocida, usándose células del ojo contralateral cuando el daño es en un solo ojo, y células de un donante cuando el daño es bilateral. Se pueden usar células histocompatibles de un donante vivo, o células no compatibles de donantes cadáver. La posibilidad de expandir *ex vivo* estas células puede reducir el riesgo de deficiencia de células del limbo del ojo sano o del donante⁶⁸. La combinación de células del limbo con membrana amniótica se usa con éxito para promover una rápida reepitelización de la córnea. En España al menos 2 grupos de investigación (Vall d'Hebron y Clínica Universitaria) han implantado células madre limbocorneales con éxito en pacientes con insuficiencia limbocorneal completa, consiguiendo en la re-epiteliza-

ción de la córnea una mejoría de la agudeza visual de los pacientes.

La retina neural y el epitelio pigmentario de la retina se desarrollan durante el periodo postnatal temprano, y no hay evidencia de regeneración en la edad adulta. Ha sido ampliamente documentada la presencia de células madre en la retina de peces y anfibios. Sin embargo, hasta el año 2000 no se habían identificado células progenitoras de la retina en mamíferos. Estas células se encuentran en muy baja frecuencia en la zona ciliar marginal y tienen muchas propiedades asociadas con las células madre: son capaces de proliferar y expresar el marcador neuroectodérmico nestina; son multipotentes y pueden autorrenovarse. La identificación de células progenitoras de la retina abre la posibilidad de su uso para tratamiento en degeneraciones retinianas como la retinitis pigmentosa, el glaucoma y la degeneración macular. El éxito del uso de células madre retinianas para la regeneración de la retina depende de la posibilidad de restaurar los complejos circuitos establecidos en la retina, ya que aunque el entendimiento actual de las conexiones dentro de la retina es muy importante, se conoce menos cómo se controla el proceso que lleva a estas conexiones entre las células.

Además se están llevando a cabo estudios experimentales con otros tipos de células madre, como células madre neurales, células madre embrionarias, células madre derivadas de la médula ósea, etc. que tratan de confirmar el potencial del trasplante de células madre en este contexto y contribuyen al conocimiento de los mecanismos de diferenciación y de integración de las células transplantadas en la retina, que conduzca a un adecuado procesamiento visual.

Terapia celular en dermatología

La epidermis es un epitelio estratificado compuesto por queratinocitos, una célula especializada que es, entre otras cosas, responsable de la renovación epidérmica. Debido a su situación como capa más externa del cuerpo, la epidermis está sometida a constantes agresiones y por tanto está en un proceso de renovación

continuo. Este proceso de renovación es posible por la existencia de células madre epidérmicas distribuidas en la capa basal y sobre todo en los folículos pilosos. Como ocurre en otros tejidos, y a pesar del intenso trabajo realizado, tampoco se conoce un marcador definitivo de las células madre epidérmicas, aunque estas células expresan niveles altos de integrinas β_1 y α_6 y niveles bajos de CD71, pero estas características no son exclusivas de las células madre epidérmicas. Otros marcadores propuestos, como la keratina 15, AC133-2 (una isoforma de CD133) y el factor de transcripción p63 no parecen ser exclusivos de estas células.

Algo que si está claro es la capacidad de cultivar células madre epidérmicas que forman colonias, las cuales pueden ser cultivadas en serie en condiciones apropiadas y alcanzar una enorme expansión de su población hasta generar un epitelio. Esto ha permitido desde hace años generar cantidades suficientes de epitelio cultivado para trasplantar a pacientes con grandes quemaduras.

Terapia celular en enfermedades musculares

El músculo ha sido reconocido recientemente como otra importante fuente de células madre adultas. Las células progenitoras musculares más importantes son las células satélite, que no sólo contribuyen a la regeneración de miofibras, sino que se han demostrado capaces de diferenciarse en otras líneas celulares como osteoblastos, condrocitos y adipocitos. Si embargo, además de las células satélite, existen otras poblaciones de células madre en el músculo con un mayor potencial de diferenciación. El origen de estas células, bien existentes en el músculo⁶⁹ o procedentes de otros órganos como la médula ósea⁷⁰ se desconoce con precisión, pero en cualquier caso estas células serían las progenitoras de las propias células satélite.

La mayoría de las lesiones musculares son reparadas espontáneamente, sin que quede deterioro funcional, pero en algunas circunstancias, debido a la importancia de la herida, ésta no cura completamente y se forma tejido cicatricial que impide la recu-

peración funcional completa. En estos casos la curación de la lesión podría ser mejorada aumentando la regeneración de fibras musculares e inhibiendo la fibrosis. El trasplante de células progenitoras musculares podría curar esas importantes lesiones. Muchos de los esfuerzos de los investigadores que trabajan en patología muscular se centran en determinar la forma de corregir miopatías congénitas tales como la distrofia muscular de Duchenne, enfermedad caracterizada por la ausencia de expresión de distrofina, una proteína de membrana imprescindible para mantener la integridad estructural de las miofibras. A lo largo de la vida del enfermo se produce una destrucción crónica del tejido muscular y aunque inicialmente, las células satélites son capaces de regenerar el músculo, progresivamente van agotando su capacidad de proliferar. El objetivo del tratamiento sería conseguir células musculares con genoma normal capaces de formar miofibras que se injerten y regeneren el músculo atrofiado.

Se han utilizado modelos experimentales de enfermedad de Duchenne, más concretamente en ratones mdx1 (ratones transgénicos deficientes en distrofina) para determinar la capacidad de distintos tipos de células madre de contribuir a regenerar el músculo esquelético. De forma análoga a la regeneración cardíaca, los primeros estudios en modelos de distrofia muscular se realizaron con mioblastos esqueléticos, es decir células progenitoras musculares. Aunque los resultados iniciales en los años 90 no fueron positivos, permitieron determinar una serie de aspectos como la importancia de la inmunosupresión y la forma de administración de células que posteriormente han sido de gran utilidad a la hora de diseñar estudios nuevos⁷¹. De forma más reciente, distintos grupos han utilizado otras fuentes de células madre con la esperanza de poder utilizar una vía sistémica de administración^{72,73}. En estos estudios se ha podido demostrar que utilizando células obtenidas de médula ósea de ratones, un pequeño número de células contribuyen a formar fibras musculares con expresión de distrofina. A pesar de intentos posteriores, el grado de contribución de las células de médula ósea que se ha observado en los distintos

estudios hasta el día de hoy es muy escaso (menor del 1%). Una de las principales limitaciones para el éxito de la terapia celular en pacientes con distrofias musculares es la escasa supervivencia de las células una vez implantadas a pesar de que el implante se realice directamente en el músculo⁷⁴, así como el hecho de que el tratamiento se tendría que realizar entre un donante y un receptor no idénticos y por tanto supeditado a problemas de rechazo inmunológico.

Terapia celular en traumatología

El organismo tiene una importante capacidad de reconstruir los huesos, cartílagos y tendones dañados, gracias a la capacidad regenerativa de las células progenitoras presentes en las estructuras lesionadas. Por ahora estamos lejos de conocer el origen y características fenotípicas de estas células progenitoras y los factores que gobiernan la formación y remodelación de los huesos. A pesar de este desconocimiento, ha sido posible la utilización de células maduras como forma de contribuir a la regeneración de tejidos óseos y cartilaginosos, y concretamente la utilización de células de cartílago cultivadas es un ejemplo de cómo el autotrasplante de células maduras puede ser un tratamiento eficaz para la reparación de la superficie articular⁷⁵.

Más atractiva resulta la posibilidad de utilizar células madre con capacidad de diferenciarse hacia tejidos de estirpe mesenquimal como el hueso o el cartílago. Las células madre mesenquimales (MSC) se pueden obtener a partir de médula ósea pero también de grasa e incluso otros tejidos. Son capaces, *in vitro*, de autorrenovarse y proliferar extensamente, sin perder su capacidad de diferenciarse hacia osteoblastos, condrocitos, adipocitos o incluso músculo esquelético según las condiciones en las que se cultivan. Estas cualidades han permitido su utilización para la reparación de lesiones óseas extensas normalmente utilizando algún tipo de soporte en la colocación de las células. Igualmente también se han utilizado para tratar defectos cartilaginosos y lesiones traumáticas, pudiendo substituir a los injertos de condrocitos, con la ventaja de su mayor capacidad proliferativa y de

supervivencia, al no tratarse de células maduras sino de progenitoras.

También se han utilizado células mesenquimales en el tratamiento de niños con osteogénesis imperfecta⁷⁶. En este estudio, los niños recibieron tratamiento mediante trasplante alogénico, pudiendo demostrarse a los meses del trasplante un mejoría muy significativa en la calidad y cantidad de tejido óseo formado y demostrando la capacidad de las células mesenquimales injertadas de generar osteoblastos y sintetizar nueva matriz ósea.

Terapia celular en enfermedades hepáticas

Un número importante de enfermos hepáticos pueden curarse gracias al trasplante hepático que restituye un órgano enfermo por un órgano sano. De igual forma que en otros tipos de trasplantes de órganos, las dificultades técnicas junto con la escasez de órganos hacen que el número de pacientes que se benefician de esta terapéutica sea mucho menor que el número de potenciales candidatos. La posibilidad de utilizar células madre de distintos orígenes o incluso hepatocitos maduros modificados genéticamente aparece como una alternativa de gran interés. Vaya por delante que no existen en la actualidad estudios clínicos de regeneración hepática con células madre y tan solo se han realizado algunos estudios clínicos utilizando el trasplante de hepatocitos con escaso éxito. Sin embargo, existen estudios experimentales que sugieren la posibilidad de regenerar tejido hepático a partir de células madre.

Las células madre embrionarias tienen una indudable capacidad de diferenciarse en hepatocitos maduros *in vitro*, sin embargo existen muy escasos estudios *in vivo*, que hayan podido demostrar la eficacia de las células embrionarias en la regeneración hepática, existiendo además el problema de la generación de tumores a partir de dichas células embrionarias⁷⁷.

La posibilidad de regenerar tejido hepático con células madre hematopoyéticas se describió por primera vez por el grupo de Petersen⁷⁸ en el que observaron la contribución de células de médula ósea a la regene-

ración del hígado a través de la diferenciación hacia células ovales. Utilizando un modelo de ratón transgénico análogo a la tirosinemia humana tipo I, Lagasse demostró la capacidad de las células madre hematopoyéticas de rescatar animales con dicha enfermedad con la consiguiente implicación clínica⁷⁹. Aunque como ya hemos comentado no existen estudios clínicos, sí que existen observaciones en pacientes sometidos a trasplante de médula ósea en los que se ha podido demostrar que células derivadas del donante son capaces de adquirir características de células hepáticas, apoyando en humanos las observaciones de Lagasse y Petersen. La principal limitación de estos estudios es que datos posteriores obtenidos por diversos grupos de investigación sugieren que la mayor parte de los fenómenos de regeneración hepática observados a partir de células madre hematopoyéticas se deben realmente a la capacidad de fusión de las células trasplantadas con los hepatocitos existentes en el animal, y por tanto no a una auténtica transdiferenciación⁸⁰. Aunque el mecanismo que contribuye a la regeneración de los hepatocitos es de indudable interés desde el punto de vista biológico, el hecho de que se trate de fusión celular o de auténtica transdiferenciación no disminuye su interés desde el punto de vista clínico. Es decir, incluso en el caso de que las observaciones experimentales de regeneración hepática se debieran mayoritariamente a fusión celular, sería posible que resultaran clínicamente beneficiosas en pacientes.

La existencia de un compartimento hepático de células madre ya se sugirió hace más de 40 años⁸¹. Las células ovales fueron las primeras candidatas a células madre hepáticas. Localizadas en los canales de Hering, son células madre multipotenciales capaces de diferenciarse a hepatocitos así como a epitelio ductal y que poseen algunos antígenos comunes con células de médula ósea. Sin duda esta población celular tiene cierta capacidad de regeneración hepática, pero a día de hoy permanece sin definir, si realmente su origen está en el hígado o por el contrario derivan de células de la médula ósea.

Estudios recientemente publicados sugieren que una población de células

madre bien caracterizada como las células madre mesenquimales pueden contribuir a la regeneración hepática. Como hemos mencionado anteriormente la principal fuente de células madre mesenquimales es la médula ósea, si bien es posible derivar dichas células a partir de otros tejidos como la grasa. Son células no hematopoyéticas de origen mesodérmico en las que al menos *in vitro* se ha podido demostrar su capacidad de diferenciarse a hepatocitos maduros y funcionales⁸². El potencial *in vivo* de esta población de células madre no está definido en la actualidad.

Terapia celular en enfermedades renales

Un objetivo primordial de la terapia regenerativa es la reposición, reparación o mejora de la función biológica de tejidos u órganos dañados. En el caso del riñón esto puede suponer una tarea extraordinaria. Por un lado el riñón posee una estructura muy compleja, en la que se pueden detectar hasta 26 tipos de células terminalmente diferenciadas, que a su vez derivan de 4 tipos celulares surgidos en el mesodermo intermedio durante el desarrollo embrionario. Además, a diferencia de otros órganos en los que se ha demostrado la existencia de células con características de pluripotencialidad y capacidad regenerativa, en el riñón adulto no se ha podido demostrar de forma concluyente la existencia de células madre. Maeshima y col han demostrado recientemente la existencia en el riñón, de unas células denominadas LRC (*label-retaining cells*) por su capacidad para permanecer marcadas por la bromodeoxiuridina durante periodos prolongados de tiempo⁸³. Las células que proliferan durante el proceso de regeneración tubular parecen ser derivadas de esta población LRC. Si estas células constituyen auténticas células madre renales y participan en el proceso de recuperación que sigue al daño isquémico del riñón, el descubrimiento de agentes capaces de estimular su diferenciación podría constituir un avance en el tratamiento de las enfermedades renales.

Otra vía de actuación posible sería la utilización de células madre pluripotencia-

les que tuvieran la capacidad de diferenciarse a células renales maduras. Las células madre de origen embrionario, trasplantadas en ratones inmunodeficientes, son capaces de desarrollar teratomas que contienen estructuras de todas las capas embrionarias, incluyendo glomérulos y túbulos renales. Ya que todo el riñón excepto su aporte neural es de origen mesodérmico, se puede pensar que se origina a partir de una célula riñón específica derivada de una célula madre embrionaria. Si tal célula existe, estaría localizada en algún lugar del mesodermo intermedio en una fase de la embriogénesis. Aunque tal célula madre renal exista y pueda ser identificada, conseguir que se divida y sea capaz de originar los precursores capaces de organizarse en un riñón adulto, es evidentemente mucho más complejo que derivar de una línea de células madre embrionarias un tipo celular cualquiera.

CONCLUSIONES

A lo largo de las páginas anteriores hemos tratado de presentar una perspectiva general, quizá un poco superficial, de lo que la terapia celular y las células madre podrían representar en el futuro. No tenemos ninguna duda de que las posibilidades son enormes, pero, sin embargo, es muy importante que seamos conscientes de que estamos todavía muy lejos de alcanzar el objetivo de utilizar clínicamente esta nueva herramienta. Este es el mensaje más importante que queremos transmitir: a pesar de las enormes expectativas que existen para pacientes con enfermedades incurables es imprescindible eludir el optimismo exagerado y continuar desarrollando una investigación de calidad científica que nos permita alcanzar nuestros objetivos.

No sabemos si la terapia celular llegará a curar la diabetes o la enfermedad de Parkinson, pero si lo hace, seguro que no será en los próximos 5 años, ni con células madre adultas ni con células madre embrionarias. Los obstáculos existentes son enormes, y es responsabilidad de los médicos e investigadores no manipular no transmitir esperanzas erróneas e infundadas a los pacientes, que a la larga se volverán contra nosotros.

BIBLIOGRAFÍA

1. THOMSON JA, ITSKOVITZ-ELDOR J, SHAPIRO SS, WAKNITZ MA, SWIERGIEL JJ, MARSHALL VS et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-1147.
2. WEISSMAN IL, ANDERSON DJ, GAGE F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2001; 17: 387-403.
3. SHAMBLOTT MJ, AXELMAN J, WANG S, BUGG EM, LITTLEFIELD JW, DONOVAN PJ et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13726-13731.
4. EVANS MJ, KAUFMAN MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981 ;292: 154-156.
5. GELSEN N, HOROSCHAK M, KIM K, GRIBNAU J, EGGAN K, DALEY GQ. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 2004; 427: 148-154.
6. HUBNER K, FUHRMANN G, CHRISTENSON LK, KEHLER J, REINBOLD R, DE LA FUENTE R et al. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 2003; 300: 1251-1256.
7. TOYOOKA Y, TSUNEKAWA N, AKASU R, NOCE T. Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 11457-11462.
8. SHAMBLOTT MJ, AXELMAN J, LITTLEFIELD JW, BLUMENTHAL PD, HUGGINS GR, CUI Y et al. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 113-118.
9. RAFF M. Adult stem cell plasticity: fact or artifact? *Annu Rev Cell Dev Biol* 2003; 19: 1-22.
10. KRAUSE DS, THEISE ND, COLLECTOR MI, HENEGARU O, HWANG S, GARDNER R et al. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 2001; 105: 369-377.
11. GRANT MB, MAY WS, CABALLERO S, BROWN GA, GUTHRIE SM, MAMES RN et al. Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization. *Nat Med* 2002; 8: 607-612.
12. JIANG Y, JAHAGIRDAR BN, REINHARDT RL, SCHWARTZ RE, KEENE CD, ORTIZ-GONZALEZ XR et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 2002; 418: 41-49.
13. TERADA N, HAMAZAKI T, OKA M, HOKI M, MÁSTALERZ DM, NAKANO Y et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002; 416: 542-545.
14. ALVAREZ-DOLADO M, PARDAL R, GARCIA-VERDUGO JM, FIKE JR, LEE HO, PFEFFER K et al. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003; 425: 968-973.
15. WAGERS AJ, SHERWOOD RI, CHRISTENSEN JL, WEISSMAN IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002; 297: 2256-2259.
16. EFRAT S. Cell replacement therapy for type 1 diabetes. *Trends Mol Med* 2002; 8: 334-339.
17. SORIA B, ROCHE E, BERNA G, LEON-QUINTO T, REIG JA, MARTIN F. Insulin-secreting cells derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000; 49: 157-162.
18. LECHNER A, HABENER JF. Stem/progenitor cells derived from adult tissues: potential for the treatment of diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284: E259-266.
19. HESS D, LI L, MARTIN M, SAKANO S, HILL D, STRUTT B et al. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 763-770.
20. HIRSCH E, GRAYBIEL AM, AGID YA. Melanized dopaminergic neurons are differentially susceptible to degeneration in Parkinson's disease. *Nature* 1988; 334: 345-348.
21. ARENAS E. Stem cells in the treatment of Parkinson's disease. *Brain Res Bull* 2002; 57: 795-808.
22. FISCHBACH GD, MCKHANN GM. Cell therapy for Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001; 344: 763-765.
23. DUNNETT SB, BJORKLUND A, LINDVALL O. Cell therapy in Parkinson's disease - stop or go? *Nat Rev Neurosci* 2001; 2: 365-369.
24. KERR DA, LLADO J, SHAMBLOTT MJ, MARAGAKIS NJ, IRANI DN, CRAWFORD TO et al. Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. *J Neurosci* 2003; 23: 5131-5140.
25. WICHTERLE H, LIEBERAM I, PORTER JA, JESSELL TM. Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons. *Cell* 2002; 110: 385-397.
26. RAMÓN-CUETO A, CORDERO MI, SANTOS-BENITO FF, AVILA J. Functional recovery of paraplegic rats and motor axon regeneration in their spinal cords by olfactory ensheathing glia. *Neuron* 2000; 25: 425-435.
27. HOFSTETTER CP, SCHWARZ EJ, HESS D, WIDENFALK J, EL MANIRA A, PROCKOP DJ et al. Marrow stro-

- mal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 2199-2204.
28. ZURITA M, VAQUERO J. Functional recovery in chronic paraplegia after bone marrow stromal cells transplantation. *Neuroreport* 2004; 5:1105-1108.
 29. PLUCHINO S, QUATTRINI A, BRAMBILLA E, GRITTI A, SALANI G, DINA G et al. Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 2003; 422: 688-694.
 30. ARVIDSSON A, COLLIN T, KIRIK D, KOKAIA Z, LINDVALL O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002; 8: 963-970.
 31. NAKATOMI H, KURIU T, OKABE S, YAMAMOTO S, HATANO O, KAWAHARA N et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002; 110: 429-441.
 32. SINDEN JD, RASHID-DOUBELL F, KERSHAW TR, NELSON A, CHADWICK A et al. Recovery of spatial learning by grafts of a conditionally immortalized hippocampal neuroepithelial cell line into the ischaemia-lesioned hippocampus. *Neuroscience* 1997;81:599-608.
 33. NELSON PT, KONDZIOŁKA D, WECHSLER L, GOLDSTEIN S, GEBEL J, DECESARE S et al. Clonal human (hNT) neuron grafts for stroke therapy: neuropathology in a patient 27 months after implantation. *Am J Pathol* 2002; 160: 1201-1206.
 34. KONDZIOŁKA D, WECHSLER L, GOLDSTEIN S, MELTZER C, THULBORN KR, GEBEL J et al. Transplantation of cultured human neuronal cells for patients with stroke. *Neurology* 2000; 55: 565-569.
 35. COWIE MR, MOSTERD A, WOOD DA, DECKERS JW, POOLE-WILSON PA, SUTTON GC et al. The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J* 1997; 18: 208-225.
 36. PROSPER F, HERREROS J, ALEGRIA E. Utilización de células madre para la regeneración miocárdica a la insuficiencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol* 2003; 56: 935-939.
 37. REFFELMANN T, KLONER RA. Cellular cardiomyoplasty-cardiomyocytes, skeletal myoblasts, or stem cells for regenerating myocardium and treatment of heart failure? *Cardiovasc Res* 2003; 58: 358-368.
 38. STRAUER BE, KORNOWSKI R. Stem cell therapy in perspective. *Circulation* 2003; 107: 929-934.
 39. NADAL-GINARD B, KAJSTURA J, LERI A, ANVERSA P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res* 2003; 92: 139-150.
 40. MURRY CE, FIELD LJ, MENASCHE P. Cell-based cardiac repair: reflections at the 10-year point. *Circulation* 2005; 112: 3174-3183.
 41. TAYLOR DA, ATKINS BZ, HUNGSPREUGS P, JONES TR, REEDY MC, HUTCHESON KA et al. Regenerating functional myocardium: improved performance after skeletal myoblast transplantation. *Nat Med* 1998; 4: 929-933.
 42. REINECKE H, MACDONALD GH, HAUSCHKA SD, MURRY CE. Electromechanical coupling between skeletal and cardiac muscle. Implications for infarct repair. *J Cell Biol* 2000; 149: 731-740.
 43. CHACHQUES JC, ACAR C, HERREROS J, TRAININI JC, PROSPER F, D'ATELLIS N et al. Cellular cardiomyoplasty: clinical application. *Ann Thorac Surg* 2004; 77: 1121-1130.
 44. MENASCHE P, HAGEGE AA, SCORSIN M, POUZET B, DESNOS M, DUBOC D et al. Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 2001; 357: 279-280.
 45. MENASCHE P, HAGEGE AA, VILQUIN J-T, DESNOS M, ABERGEL E, POUZET B et al. Autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41: 1078-1083.
 46. HERREROS J, PROSPER F, PEREZ A, GAVIRA JJ, GARCIA-VELLOSO MJ, BARBA J et al. Autologous intramyocardial injection of cultured skeletal muscle-derived stem cells in patients with non-acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2003; 24: 2012-2020.
 47. SMITS PC, VAN GEUNS RJ, POLDERMANS D, BOUNTIUKOS M, ONDERWATER EE, LEE CH et al. Catheter-based intramyocardial injection of autologous skeletal myoblasts as a primary treatment of ischemic heart failure: clinical experience with six-month follow-up. *J Am Coll Cardiol* 2003; 42: 2063-2069.
 48. TOMITA S, LI RK, WEISEL RD, MICKLE DA, KIM EJ, SAKAI T et al. Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. *Circulation* 1999; 100: II247-256.
 49. KAMIHATA H, MATSUBARA H, NISHIUE T, FUJIYAMA S, TSUTSUMI Y, OZONO R et al. Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation* 2001; 104: 1046-1052.
 50. ASSMUS B, SCHACHINGER V, TEUPE C, BRITTEN M, LEHMANN R, DOBERT N et al. Transplantation of progenitor cells and regeneration enhancement in acute myocardial infarction (TOP-CARE-AMI). *Circulation* 2002; 106: 3009-3017.

51. KAWAMOTO A, TKEBUCHAVA T, YAMAGUCHI J, NISHIMURA H, YOON YS, MILLIKEN C et al. Intramyocardial transplantation of autologous endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization of myocardial ischemia. *Circulation* 2003; 107: 461-468.
52. ORLIC D, KAJSTURA J, CHIMENTI S, JAKONIUK I, ANDERSON SM, LI B et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001; 410: 701-705.
53. KOCHER AA, SCHUSTER MD, SZABOLCS MJ, TAKUMA S, BURKHOF D, WANG J et al. Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat Med* 2001; 7: 430-436.
54. ASAHARA T, MUROHARA T, SULLIVAN A, SILVER M, VAN DER ZEE R, LI T et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275: 964-967.
55. ASAHARA T, MÁSUDA H, TAKAHASHI T, KALKA C, PASTORE C, SILVER M et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999; 85: 221-228.
56. PEICHEV M, NAHYER AJ, PEREIRA D, ZHU Z, LANE WJ, WILLIAMS M et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000; 95: 952-958.
57. SHI Q, RAFII S, WU MH, WIJELATH ES, YU C, ISHIDA A et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; 92: 362-367.
58. KAWAMOTO A, GWON HC, IWAGURO H, YAMAGUCHI JI, UCHIDA S, MÁSUDA H et al. Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation* 2001; 103: 634-637.
59. TAKAHASHI T, KALKA C, MÁSUDA H, CHEN D, SILVER M, KEARNEY M et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5: 434-438.
60. PITTENGER MF, MACKAY AM, BECK SC, JAISWAL RK, DOUGLAS R, MOSCA JD et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
61. TOMA C, PITTENGER MF, CAHILL KS, BYRNE BJ, KESSLER PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 2002; 105: 93-98.
62. MAKINO S, FUKUDA K, MIYOSHI S, KONISHI F, KODAMA H, PAN J et al. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103: 697-705.
63. SHAKE JG, GRUBER PJ, BAUMGARTNER WA, SENECHAL G, MEYERS J, REDMOND JM et al. Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects. *Ann Thorac Surg* 2002; 73: 1919-1925; discussion 26.
64. ESPAÑA EM, GRUETERICH M, ROMANO AC, TOUHAMI A, TSENG SC. Idiopathic limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology* 2002; 109: 2004-2010.
65. PELLEGRINI G, DELLAMBRA E, GOLISANO O, MARTINELLI E, FANTOZZI I, BONDANZA S et al. p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; 98: 3156-3161.
66. TSENG SC. Significant impact of limbal epithelial stem cells. *Indian J Ophthalmol* 2000; 48: 79-81.
67. TSENG SC, PRABHASAWAT P, BARTON K, GRAY T, MELLER D. Amniotic membrane transplantation with or without limbal allografts for corneal surface reconstruction in patients with limbal stem cell deficiency. *Arch Ophthalmol* 1998; 116: 431-441.
68. TSENG SC, MELLER D, ANDERSON DF, TOUHAMI A, PIRES RT, GRUETERICH M et al. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane for treating corneal diseases with total limbal stem cell deficiency. *Adv Exp Med Biol* 2002; 506: 1323-1334.
69. QU-PETERSEN Z, DEASY B, JANKOWSKI R, IKEZAWA M, CUMMINS J, PRUCHNIC R et al. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 2002; 157: 851-864.
70. LABARGE MA, BLAU HM. Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell* 2002; 111: 589-601.
71. SKUK D, TREMBLAY JP. Myoblast transplantation: the current status of a potential therapeutic tool for myopathies. *J Muscle Res Cell Motil* 2003; 24: 285-300.
72. GUSSONI E, SONEOKA Y, STRICKLAND CD, BUZNEY EA, KHAN MK, FLINT AF et al. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 1999; 401: 390-394.
73. FERRARI G, CUSELLA-DE ANGELIS G, COLETTA M, PAOLUCCI E, STORNAIUOLO A, COSSU G et al. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530.
74. BEAUCHAMP JR, MORGAN JE, PAGEL CN, PARTRIDGE TA. Dynamics of myoblast transplantation

- reveal a discrete minority of precursors with stem cell-like properties as the myogenic source. *J Cell Biol* 1999; 144: 1113-1122.
75. BRITTEBERG M, LINDAHL A, NILSSON A, OHLSSON C, ISAKSSON O, PETERSON L. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med* 1994; 331: 889-895.
76. HORWITZ EM, PROCKOP DJ, FITZPATRICK LA, KOO WW, GORDON PL, NEEL M et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 1999; 5: 309-313.
77. YAMAMOTO H, QUINN G, ASARI A, YAMANOKUCHI H, TERATANI T, TERADA M et al. Differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes: biological functions and therapeutic application. *Hepatology* 2003; 37: 983-893.
78. PETERSEN BE, BOWEN WC, PATRENE KD, MARS WM, SULLIVAN AK, MURASE N et al. Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. *Science* 1999; 284: 1168-1170.
79. LAGASSE E, CONNORS H, AL-DHALIMY M, REITSMA M, DOHSE M, OSBORNE L et al. Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 2000; 6: 1229-1234.
80. WANG X, WILLENBRING H, AKKARI Y, TORIMARU Y, FOSTER M, AL-DHALIMY M et al. Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes. *Nature* 2003.
81. GRISHAM JW, HARTROFT WS. Morphologic identification by electron microscopy of "oval" cells in experimental hepatic degeneration. *Lab Invest* 1961; 10: 317-332.
82. SCHWARTZ RE, REYES M, KOODIE L, JIANG Y, BLACKSTAD M, LUND T et al. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J Clin Invest* 2002; 109: 1291-1302.
83. MAESHIMA A, YAMASHITA S, NOJIMA Y. Identification of renal progenitor-like tubular cells that participate in the regeneration processes of the kidney. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 3138-3146.