

5. Envejecimiento de las células madre

MARÍA CASCALES ANGOSTO

RESUMEN

El envejecimiento es el resultado del descenso replicativo de las células madre adultas, cuya función es el mantenimiento y reparación de los tejidos. La doble capacidad de autorrenovación y diferenciación de estas células está controlada por interacción directa con un microambiente específico «el nicho». Las células madre adultas son la fuente de reemplazo de las células dañadas o destruidas durante la vida del organismo. El descenso en la proliferación y función de las células madre va unido al incremento en la expresión de p16^{INK4a}, un inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina, que se asocia con la senescencia. Muchas de las situaciones patológicas de la senectud, son consecuencia del desequilibrio entre la pérdida y la renovación tisular. Por tanto, los fenómenos asociados a la edad pueden interpretarse como signos de senescencia de las células madre adultas, lo que sugiere que un organismo es tan viejo como lo son sus células madre.

Palabras clave: Células madre adultas. Envejecimiento.

ABSTRACT

Aging results from a replicative decline in adult stem cells, whose function is the maintenance and repair of tissues. The dual ability for self-renewal and multilineage differentiation of these cells is controlled by direct interaction with a specific microenvironment, the «stem cell niche». Adult stem cells are the source for replacing cells damaged or

lost during the entire life of an organism. The decline in adult stem cell proliferation and function correlates with the increased expression of p16^{INK4a}, a cyclin-dependent kinase inhibitor, linked to senescence. Many of the pathological conditions affecting the elderly are the consequence of an imbalance between cell loss and tissue renewal. Hence, aging phenomena can be interpreted as signs of aging at the level of somatic stem cells which suggests that a human body is as old as its stem cells.

Key words: Adult stem cells, aging.

INTRODUCCIÓN

El envejecimiento es un proceso complejo que afecta a cada célula y cada órgano y conlleva el deterioro de las funciones del organismo. La menor capacidad de regeneración de los órganos y tejidos, y la mayor propensión a infecciones y al cáncer, son los rasgos prominentes de la senectud. Entre las características típicas de la senectud, que definen el declinar de la función e integridad del organismo, está el envejecimiento de los compartimentos de las células madre y de las células progenitoras, que va unido a una reducida capacidad replicativa y, como consecuencia, de la capacidad regeneradora de los tejidos. La evidencia que asocia la disfunción de las células madre a las condiciones fisiopatológicas que acompañan al envejecimiento, tiene su base en los mecanismos implicados en la función disminuida de estas células, lo cual contribuye de manera importante a la patogénesis de la enfermedad (1-6).

Aunque el envejecimiento es uno de los procesos más reconocidos de la biología, es también uno de los menos conocidos, debido a su complejidad fisiológica y fenotípica. Esta complejidad es lo que impide emitir una definición simple que comprenda todos los cambios que se asocian al transcurrir de los años. Numerosos estudios realizados hasta la fecha, han demostrado que la vejez va unida a una menor capacidad de mantener la homeostasis tisular y la reparación de los tejidos después de la lesión, de tal manera que cuando el control homeostático disminuye, hasta el punto que no pueda mantenerse la integridad y función del órgano/tejido, es cuando se manifiesta la senectud. Por tanto, muchas de las condiciones fisiopatológicas que afligen a la vejez, tales como anemia, sarcopenia y osteoporosis, etc., son una consecuencia del desequi-

librio entre la pérdida celular y la renovación tisular, debidas a la menor replicación y función de las células madre, que se asocian a muchos de los fenotipos característicos del envejecimiento (1-3).

CÉLULAS MADRE ADULTAS

La función de células madre es vital en todas las etapas de la vida, aunque los papeles específicos que juegan en cada una de ellas varían de manera considerable. Así, en las etapas tempranas de la embriogénesis, las células madre pluripotentes se diferencian para dar origen a los tres estratos germinales (7, 8), y así como procede el desarrollo, distintos subgrupos de células madre emergen para dirigir la formación de órganos y tejidos. Una vez que los tejidos están establecidos, la misión de las células madre sufre un cambio, desde su intervención en el desarrollo y formación de dichos tejidos en el estado embrionario, hacia el mantenimiento y restauración tisular a lo largo de la vida adulta. Las células madre específicas de un tejido derivan de células madre preexistentes por autorrenovación, y no por generación *de novo* a partir de progenitores más primitivos. Según esto, las células madre, tanto en la juventud como en el estado adulto y en la vejez, derivan de células madre de origen fetal a través de su capacidad de autorrenovación a largo término, y así, el envejecimiento de un linaje de células madre puede considerarse que comienza con la especificidad definitiva de tal linaje y es posterior a cualquier incorporación adicional de progenitores más primitivos (2).

Aunque la vulnerabilidad a las enfermedades infecciosas y al cáncer está causada por un decaimiento de la función del sistema inmune, éste es a su vez, producto de interacciones entre las células madre hematopoyéticas y el microambiente en la médula ósea y el timo (9), como también de la mucosa que tapiza los bronquios y los sistemas digestivos. Por tanto, todos los cambios que tienen lugar en la vejez, tales como el deterioro tisular, y la propensión a las infecciones, pueden interpretarse como signos de la edad a nivel de las células madre adultas. Como los procesos regenerativos de un organismo vivo están determinados por la capacidad potencial de sus células madre para reemplazar el tejido dañado, puede considerarse que un organismo vivo es tan viejo como sus células madre (10).

Las células madre adultas aseguran la regeneración y renovación de los tejidos a lo largo de la vida. Si este efecto fuera perfecto, las células serían reemplazadas indefinidamente y el organismo no acusaría los efectos indeseables de la vejez. Como parece ser que el organismo envejece como consecuencia del envejecimiento de sus células madre, la investigación sobre los cambios que sufren estas células madre asociados a la edad, presenta un enorme interés por dos razones: porque las células madre suponen un buen modelo para estudiar el envejecimiento, ya que ellas proporcionan la base de la regeneración de los tejidos envejecidos y porque encontrar el medio de reactivar las células madre y controlar su destino, puede crear magníficas oportunidades para el tratamiento de las enfermedades degenerativas de la edad avanzada.

Las células somáticas normales cultivadas *in vitro*, dejan de proliferar después de un cierto número de divisiones antes de entrar en el estado de senescencia replicativa, en el cual las células son viables y metabólicamente activas, pero han perdido la capacidad de proliferar. No hay que confundir el estado senescente con el estado reversible de quiescencia, en el que las células se encuentran en reposo proliferativo, o fase G0 del ciclo celular. Desde la primera descripción de senescencia replicativa, se ha especulado mucho sobre cuál es el proceso que gobierna el envejecimiento del organismo, en base a dos cuestiones fundamentales: ¿Es el envejecimiento resultado de un programa genético o es provocado por acontecimientos accidentales o fortuitos? (11).

En general, las células madre adultas tienen un recambio bajo y residen en nichos especializados, que las protegen del medio ambiente y las activan en determinados momentos. La mayoría de ellas permanecen en la fase G0 (estado quiescente), en contraste con las células progenitoras amplificadoras transitorias (TA). El nicho es el que gobierna la división celular asimétrica que ha de proporcionar la autorrenovación o la diferenciación y juega también un papel importante en la regulación del envejecimiento (12)

CÉLULAS MADRE EN EL ÓRGANO NORMAL

Aunque el concepto de células madre fue introducido hace un siglo por Alexander Maximov (13), la moderna investigación comenzó en

1963 cuando Siminovitch, Culloch y Till (14), consiguieron detectar las células madre hematopoyéticas (HSC). Primero demostraron que las células de la médula ósea podían reconstituir la hematopoyesis y rescatar animales irradiados con dosis letales. Segundo, usando trasplantes seriados establecieron la capacidad autorrenovadora de las células originales de la médula ósea. Cuando células de colonias del bazo, obtenidas de los primeros receptores de trasplantes de médula ósea, fueron posteriormente trasplantadas en animales que habían recibido dosis letales de irradiación, se encontraron colonias de leucocitos y eritrocitos en los segundos receptores. En base a estos experimentos se definieron las HSC como células que poseían «capacidad de autorrenovación no restringida y diferenciación en linaje múltiple». Este descubrimiento marcó el comienzo de los días de la investigación de las células madre.

La capacidad regeneradora en cualquier órgano o tejido se desencadena por activación de las células madre quiescentes que se localizan en nichos específicos. Esta activación está normalmente mediada por señales recibidas a través de vías de señalización tales como Wnt, Hedgehog o Notch, que promueven una secuencia de eventos estrictamente regulados, a niveles genéticos y epigenéticos y por el microambiente circundante. El resultado neto de este proceso es el establecimiento de una jerarquía bien definida que comienza a partir de la célula madre poco proliferativa (quiescente) y da lugar a la amplificación transitoria de precursores tempranos y tardíos que poseen capacidad proliferativa elevada. Estos precursores generan progenitores comprometidos en el linaje y, en último lugar, células diferenciadas terminales no proliferativas, con características especializadas, necesarias para el funcionamiento del órgano. La homeostasis se consigue entre el número de células diferenciadas terminales y una nueva activación de la célula madre, de manera que se asegure el recambio celular relativo para el mantenimiento del equilibrio funcional dentro del órgano (15).

La mayoría de los tejidos que se autorrenuevan caen dentro de esta categoría. Cada vez que una célula madre se divide genera dos células hijas; una de ellas es una nueva célula madre y la otra es una célula comprometida, con asimetría conseguida sobre una población base, como también a nivel de divisiones celulares individuales. La asimetría de la población facilita la respuesta a las necesidades fisiológicas variables, por ejemplo, en caso de la cicatrización de las heridas. Las células en

cada nivel de jerarquía responden de manera diferente a señales extrínsecas, ya que cada tipo celular requiere diferentes señales específicas, para progresar al nivel siguiente. Esto demuestra la importancia del microambiente en la regulación de la supervivencia de la célula madre y en la protección de su composición genética, que es la que imparte la diversidad funcional de las células diferenciadas en el órgano.

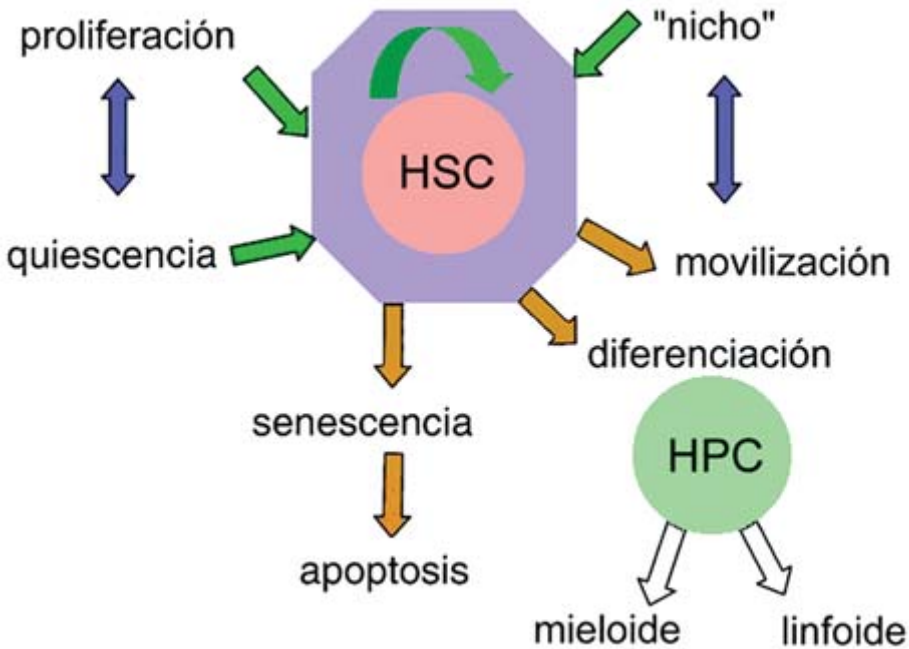


FIGURA 1. *Procesos biológicos que afectan a las células madre. La biología de las células madre implica muchos procesos celulares diferentes necesarios para mantener el reservorio de las células madre hematopoyéticas (HSC) y su funcionalidad durante las condiciones ambientales variables a lo largo de la vida. La dotación de células madre se mantiene cuidadosamente mediante el estricto equilibrio entre proliferación vs. quiescencia y autorrenovación vs. diferenciación y la relación dinámica entre la extravasación en sangre y linfa (movilización) vs. el mantenimiento en un nicho de la médula ósea. Defectos en cualquiera de estos procesos supone una situación de estrés que las conducirá a la senescencia o a la apoptosis. La disminución del número de células madre y de sus funciones dará lugar a la pérdida del potencial renovador y afectará la longevidad. Las flechas verdes indican los procesos celulares que favorecen el mantenimiento de la población de HSC, mientras que las flechas marrones indican aquellos factores que las comprometen para su destrucción HSC: células madre hematopoyéticas. HPC: células hematopoyéticas progenitoras (Liang y Zant 2008, modificado) (16).*

En el sistema hematopoyético, así como en otros tejidos normales, las células madre tienen la capacidad de autorrenovación, son pluripotentes y generalmente quiescentes, manteniéndose la mayor parte de su tiempo en G0. Así como las células madre pueden reparar su DNA, al autorrenovarse pueden también acumular mutaciones adquiridas tras su exposición a agentes carcinógenos. Si los tumores surgen a partir de las células madre, la acumulación de estas mutaciones debe ser lo que se ha reconocido como el proceso multiescalonado de la carcinogénesis.

La biología de las células madre implica muchos procesos celulares diferentes, necesarios para mantener el reservorio de las HSC y su funcionalidad durante las condiciones ambientales variables a lo largo de la vida. La dotación de células madre se mantiene cuidadosamente mediante el estricto equilibrio proliferación *vs.* quiescencia, autorrenovación *vs.* diferenciación y la relación dinámica entre la extravasación en sangre y linfa (movilización) *vs.* el mantenimiento en un nicho de la médula ósea. Defectos en cualquiera de estos procesos supone una situación de estrés que las conducirá a la senescencia o a la apoptosis. La disminución del número de células madre y de sus funciones, que implica la pérdida del potencial renovador, es una de las características del envejecimiento, que afecta la longevidad (Figura 1) (16, 17).

DETERIORO OXIDATIVO CELULAR DEPENDIENTE DE LA EDAD

La teoría basada en el deterioro oxidativo celular dependiente de la edad fue propuesta por Harman en 1956 (18), y todavía tiene absoluta vigencia. Este deterioro tiene dos componentes principales: daño oxidativo y daño replicativo. El metabolismo normal produce especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden oxidar y lesionar las membranas celulares, proteínas y ácidos nucleicos. Un ejemplo del efecto de la toxicidad de las especies reactivas de oxígeno (ROS) sobre proceso del envejecimiento se encuentra en casos de sobreexpresión de los enzimas que limitan la exposición de los componentes celulares a las ROS, tales como la catalasa y la superóxido dismutasa (SOD1). El incremento en la actividad de estos enzimas causaron un incremento en la esperanza de vida (20-30%) en la mosca *Drosophila*. Si esta sobreexpresión se dirigió a las células neuronales, las moscas vivieron incluso más, lo que indica que el

sistema nervioso es susceptible de lesión por las ROS y que tal lesión afecta la longevidad. En mamíferos, la conexión entre las ROS y el envejecimiento es todavía incompleta, debido a que no existe evidencia de prematuro envejecimiento en ratones que acarrean mutaciones de pérdida de función en enzimas que degradan las ROS. Además, el daño ocasionado por las ROS en el genoma mitocondrial, producido por mutaciones debidas al envejecimiento, causa defectos en la cadena de transporte electrónico que afectan la producción de energía y producen mayor cantidad de ROS. Estos defectos en la función mitocondrial asociados al envejecimiento se han detectado en muchas especies, y se ha llegado a la conclusión de que el envejecimiento está directamente relacionado con el metabolismo celular y la disminución de la función mitocondrial. Además de la mitocondria, otros orgánulos subcelulares, tales como los lisosomas, se lesionan debido a modificaciones ocasionadas por las ROS. La lipofuscina, pigmento típico de la ancianidad, se compone de material intralisosómico polimérico que no puede ser degradado por las hidrolasas lisosómicas. Existe una correlación inversa entre el acúmulo de lipofuscina, la función lisosómica y la expectativa de vida de la célula. La presencia de lipofuscina en las células madre interfiere con las funciones celulares y promueve patologías tales como enfermedades neurodegenerativas, fallo cardíaco y degeneración macular (18, 19).

Muchos mecanismos pueden estar implicados en el riesgo de oxidación y agregación de proteínas en células senescentes, entre ellos el estrés oxidativo y las ROS representan los mayores contribuyentes. El acúmulo de ROS durante el envejecimiento biológico, conduce en sus últimas causas a una extensa oxidación de las macromoléculas, DNA, proteínas y lípidos. En el caso de las proteínas, una vez modificadas por oxidación, se vuelven inestables y propensas a alteración estructural, promoviendo así la formación de agregados proteicos. Otro mecanismo implica el acúmulo de mutaciones en el DNA unido a una disminución de los sistemas de reparación. Cuando mutaciones no sinónimas ocurren en las secuencias modificadoras del DNA, se pueden sustituir aminoácidos, desestabilizar el plegamiento de la estructura nativa de las proteínas y favorecer la formación de proteínas mal plegadas. Cuando las mutaciones ocurren en sitios promotores de genes asociados con el envejecimiento y la enfermedad, se puede incrementar la transcripción y la concentración de proteínas y péptidos con propensión a la agregación. Estos agregados interfieren con las funciones normales de la célula en multitud

de vías, lo que conduce a la senescencia o a la muerte celular. Por tanto, el estrés oxidativo, las mutaciones al DNA y los mecanismos anteriormente citados, pueden estar implicados en el declinar en el número y función de las células madre por efecto del envejecimiento.

EFFECTO DE LA EDAD SOBRE LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE

A nivel fisiológico, la función de las células madre es la restauración y regeneración de los tejidos. Esta función puede ser utilizada a nivel fisiopatológico para el tratamiento de enfermedades degenerativas e incluso para mejorar las disfunciones asociadas con el envejecimiento normal. La posibilidad de que las células madre puedan tener aplicaciones terapéuticas sobre los achaques típicos de la edad plantea dos preguntas: ¿Cuál es el efecto de la edad sobre las propias células madre? y ¿En qué grado se puede atribuir el declinar de la función de un tejido a una capacidad limitada de las células madre residentes del mantenimiento de la estructura y renovación de la función de tal tejido?

La respuesta a la primera es sensible a casos específicos y como punto de partida necesita identificar y aislar las células madre, conocer su número y función y aplicar estos ensayos a lo largo de la vida del individuo, para evaluar los cambios asociados a la edad, tratando de comprender las causas y mecanismos de estos cambios. La respuesta a la segunda pregunta es mucho más difícil de conseguir por medios experimentales, debido a la conexión estrecha entre las células madre y los tejidos en los que residen. Como tal, no hay tejido para el cual se haya emitido una respuesta definitiva. Además, el problema es muy diferente según se trate de un tejido con potencial regenerativo celular alto en respuesta al daño, o recambio celular bajo y potencial regenerativo insignificante (Figura 2) (5).

Un número de factores interfiere con la potencia de la población de células madre durante el envejecimiento. Si el envejecimiento se mira como el acúmulo en un organismo de células de usar y tirar, el ritmo y el grado del envejecimiento de dicho organismo son un reflejo de cómo la célula contrarresta los efectos deletéreos del ambiente. Entre las muchas teorías que se han emitido se han seleccionado dos, una basada en la evolución y otra basada en el daño. Muchos biólogos evolucionis-

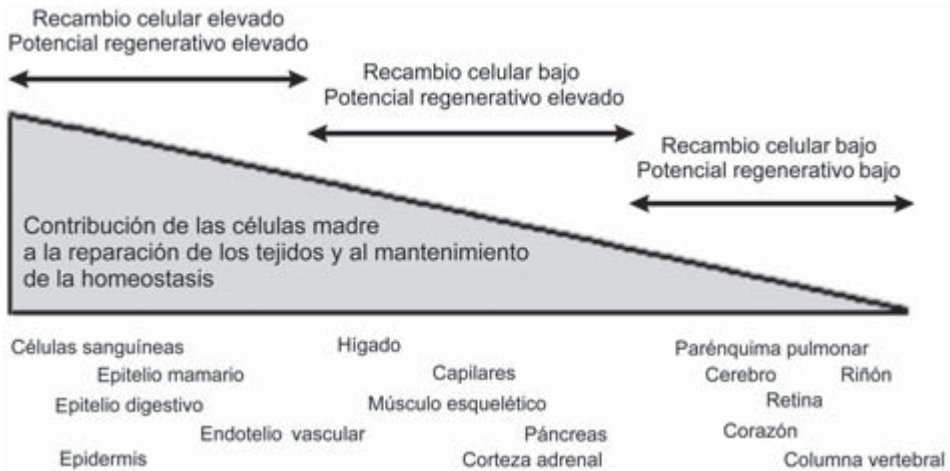


Figura 2. **Heterogeneidad tisular y funcionalidad de las células madre para la reparación y el mantenimiento de la homeostasis.** El grado al cual los efectos de la edad sobre las células madre residentes determinan el fenotipo de un tejido se relaciona con el grado al cual las células madre son responsables de la reparación y mantenimiento de la homeostasis de dicho tejido. Los tejidos con elevado recambio (sangre, piel y tubo digestivo,) tienen un compartimento prominente de células madre y poseen una elevada capacidad regenerativa. Los tejidos con recambio bajo, pero elevada capacidad regenerativa, pueden usar estrategias diferentes para asegurar el recambio efectivo en respuesta a la lesión aguda. Por ejemplo, en músculo esquelético, las miofibrillas diferenciadas son incapaces de proliferar para regenerar nuevo tejido, de forma que el músculo ha de recurrir a las células madre residentes para el recambio y reparación. En el caso del hígado, los hepatocitos diferenciados pueden proliferar y remodelar el tejido mediante el reemplazo de los hepatocitos perdidos. Por último, los tejidos con bajo recambio y potencial regenerativo bajo poseen células madre que median una reparación tisular limitada. Aunque existe un gran interés las células madre del cerebro y corazón para su aprovechamiento en terapéutica, solo se cuenta con una capacidad limitada de reparación endógena de estos tejidos frente a lesiones agudas (Rando 2006, modificado) (5).

tas sugieren que los genes que favorecen la reproducción de las especies ejercen efectos negativos en la última fase de la vida, limitando la longevidad. Este fenómeno se ha denominado *pleiotropía antagónica*. De acuerdo con esta teoría los organismos se mantienen jóvenes mientras permanece su competencia reproductora. Después, los genes seleccionados por sus efectos beneficiosos sobre la reproducción no se expresan. Un ejemplo de pleiotropía antagónica son los andrógenos, las hormonas responsables del crecimiento y función de la próstata en individuos jóvenes, que juega un papel importante en la generación del esperma para la reproducción, y que en la vejez contribuyen al cáncer de próstata

(12, 20). La segunda, la teoría de la acumulación de mutaciones, propuesta por Medawar en 1952 (21), propone que las mutaciones que conducen a los cambios perjudiciales asociados a la edad, se pueden acumular en sucesivas generaciones en estadios posteriores al máximo de la capacidad reproductora. Como en la naturaleza pocos individuos alcanzan edades avanzadas, tales mutaciones pueden escapar a la presión de la selección negativa. Sin embargo, hoy no se duda de que las influencias genéticas ejercen un importante papel en el ritmo del envejecimiento. La evidencia más clara la proporciona el hecho de las enormes diferencias en la longevidad máxima entre las especies.

Otra teoría, la de la senescencia replicativa, fue introducida en 1961 por Hayflick (22), como proceso que limita el número de divisiones que una célula específica puede sufrir a lo largo de la vida y que posteriormente se ha asociado a la pérdida del DNA telomérico. La senescencia replicativa o parada del crecimiento, se postuló al detectar que existía una conexión directa entre las rondas de replicación y la pérdida de los telómeros situados en los extremos de los cromosomas. Durante cada división celular se pierde DNA telomérico, porque la mayoría de las células somáticas no expresan telomerasa, la enzima responsable de reconstituir los telómeros. Se ha demostrado que la longevidad puede prolongarse en gusanos que sobreexpresan una proteína que se une a los telómeros e incrementa su longitud (HRP-1). Sin embargo, los mecanismos implicados en tal proceso no están del todo claros. Posteriores estudios han demostrado que las células afectadas sufren la senescencia antes de adquirir telómeros cortos críticos, para evitar la inestabilidad genómica que puede conducir al cáncer. Por tanto, la senescencia replicativa/parada del crecimiento no depende exclusivamente de la erosión telomérica, depende también de otros mecanismos.

Se ha demostrado que, con la edad, el proceso de autorrenovación y diferenciación en las células madre muestra una menor generación de progenia diferenciada o dirigida hacia un linaje particular (23). La división celular asimétrica se ha estudiado en un número muy limitado de tipos celulares y la evidencia experimental es débil. Por el contrario, evidencia más convincente sugiere que existe un acúmulo de cambios en el DNA de las células madre a medida que transcurre la edad, que afecta su funcionalidad. Si los cambios en el DNA alcanzan un cierto umbral, las células madre sufren apoptosis o senescencia, lo cual aumenta la

pérdida celular. Alternativamente, las células madre pueden evadir la senescencia o la apoptosis y tener el riesgo de sufrir cambios clonales que conduzcan a la formación de un tumor (Figura 3). No está claro si estos cambios ocurren en las células madre como parte de un proceso fisiológico o sólo en circunstancias de estrés extremo, o si son el resultado de un programa intrínseco de estas células, o de cambios en el microambiente en el cual ellas residen. También es materia de discusión si hay alguna vía relacionada o causal para el envejecimiento de los tejidos y la pérdida de su función o existe alguna alternativa que puede predisponer al desarrollo de tumores malignos (23).

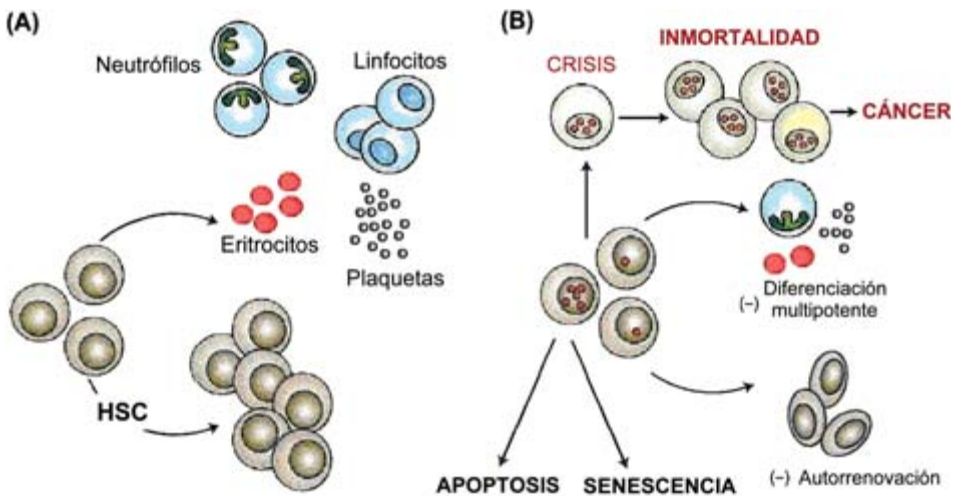


FIGURA 3. **Modelo de proliferación de células madre jóvenes y viejas.** (A) Células madre jóvenes, representadas aquí como células madre hematopoyéticas, sufren la autorrenovación, que les permite el mantenimiento del reservorio de células madre y la producción de las células efectoras diferenciadas requeridas por el organismo (neutrófilos, linfocitos, eritrocitos, plaquetas, etc). (B) La acumulación de mutaciones en el DNA con la edad, produce un estado crítico (CRISIS) en las células madre que las conduce a la apoptosis o senescencia, con la consiguiente menor capacidad para autorrenovarse y diferenciarse en el linaje hematopoyético. Las células mutadas que escapan de la apoptosis o senescencia son un riesgo de cáncer (Bellantuomo y Keith 2007, modificado) (23).

ENVEJECIMIENTO DEL NICHU DE CÉLULAS MADRE

Las células madre adultas proporcionan el medio de regenerar los tejidos viejos o deteriorados, debido a su doble capacidad de autorrenovación y diferenciación en muchos linajes. Estas dos características están

controladas por interacción directa con un microambiente específico denominado «nicho». Las células madre hematopoyéticas (HSC) residen en la médula ósea. Todavía no está claro, si las HSC pueden rejuvenecer indefinidamente o si su capacidad autorrenovadora no es indefinida y sufren la senescencia replicativa como otras células somáticas. Por otro lado, la cuestión que surge es la siguiente ¿hasta qué punto los cambios relacionados con la edad se deben a factores intrínsecos o a estímulos externos? Existe cada vez un mayor convencimiento de que el nicho juega un papel muy importante en la regulación del envejecimiento de las células madre adultas. Es este nicho el que realiza las funciones siguientes (13, 24): mantiene las HSC, como también la senescencia replicativa, protege las HSC de los radicales y compuestos tóxicos, regula las cascadas señalizadoras celulares, y modula la expresión génica y las modificaciones epigenéticas en las HSC. De esta manera, la interacción de las HSC con su nicho controla la función de estas células madre, incluyendo el propio envejecimiento de la hematopoyesis.

Varios programas intrínsecos y vías señalizadoras facilitan las características únicas de las células madre. Estos programas regulan el mantenimiento, proliferación y diferenciación, pero tienen que estar estrictamente controlados por el microambiente de acuerdo con las necesidades fisiológicas del organismo. En 1978, Schofield (25) propuso una hipótesis en la cual las células madre se encuentran asociadas con otras células que determinan su comportamiento y son las que forman el «nicho». Se han identificado para las HSC dos tipos de nicho en la médula ósea; el nicho endosteal y el nicho vascular. Las HSC más primitivas se localizan cerca del endosteum del hueso, próximas a las células del estroma y de los osteoblastos. Esta comunicación y adhesión recíprocas es lo que ha de regular la función de las HSC. Las HSC se encuentran también en la vecindad de las células endoteliales sinusoidales. Se cree que el nicho vascular forma un medioambiente que promueve la proliferación y diferenciación y la trans migración endotelial de las HSC, mientras que el nicho endosteal promueve la quiescencia y la autorrenovación (25). El mecanismo preciso de esta interacción entre las HSC y al microambiente local no se conoce aún, sin embargo, se sabe que la composición de los tipos celulares y los componentes de la matriz extracelular se encuentran en continuo cambio a lo largo de la vida. Estos cambios se reflejan en una menor formación de hueso y pérdida de masa ósea, son más pronunciados en pacientes con osteoporosis, y van acompañados por una mayor

adipogénesis y menor osteoblastogénesis. También, la composición de las células hematopoyéticas maduras cambia a lo largo de la vida.

El sistema inmune se afecta de manera especial en el envejecimiento, detectándose muy reducido el potencial de diferenciación linfoide en la médula ósea de donantes viejos. Experimentos de trasplantes han indicado que esta desviación hacia el potencial de diferenciación mieloides, asociada a la edad, se debe, probablemente, a cambios intrínsecos en las HSC viejas. Estudios recientes indican que el envejecimiento no está solo asociado con las alteraciones funcionales de las HSC, sino también con alteraciones en el microambiente que se requieren para la diferenciación hematopoyética. Las HSC de ratones jóvenes al ser trasplantadas en ratones viejos, tienen un potencial de diferenciación reducido hacia el fenotipo linfocito, lo cual no ocurre en caso de receptores jóvenes. Por otra parte, las HSC de ratones viejos también exhiben menor potencial de diferenciación linfoide debido a los cambios en el microambiente. De todo esto se deduce que el nicho de las células madre sufre grandes variaciones durante la vida del organismo, que pueden jugar un papel importante en el control externo del envejecimiento de las células madre (12).

En teoría, las HSC pueden tener un ilimitado poder de autorrenovación, incluido el rejuvenecimiento o pueden sufrir el envejecimiento celular al igual que otras células somáticas, pero hasta qué grado los cambios relacionados con la edad en estas células son debidos a factores intrínsecos o son regulados por estímulos del microambiente del nicho de las células madre. En los párrafos siguientes se describen cuatro situaciones posibles y la realidad más probable es que existan intercambios entre ellas (Figura 4).

Las HSC pueden rejuvenecer indefinidamente. La autorrenovación verdadera de las células madre indica que la célula hija posee las mismas características que la célula madre y esto debe incluir también el rejuvenecimiento. Esto las capacitará para mantener de manera indefinida el reservorio de células madre. Si es este el caso, las células madre adultas pueden proporcionar infinitas bases para la regeneración tisular. En este aspecto, la pérdida del potencial regenerativo de los tejidos viejos, se ha de atribuir a la reducción en el número de células madre primitivas. La prueba de esta tesis no es posible por la medida funcional de las HSC, que necesitaría poder discriminar entre células madre ver-

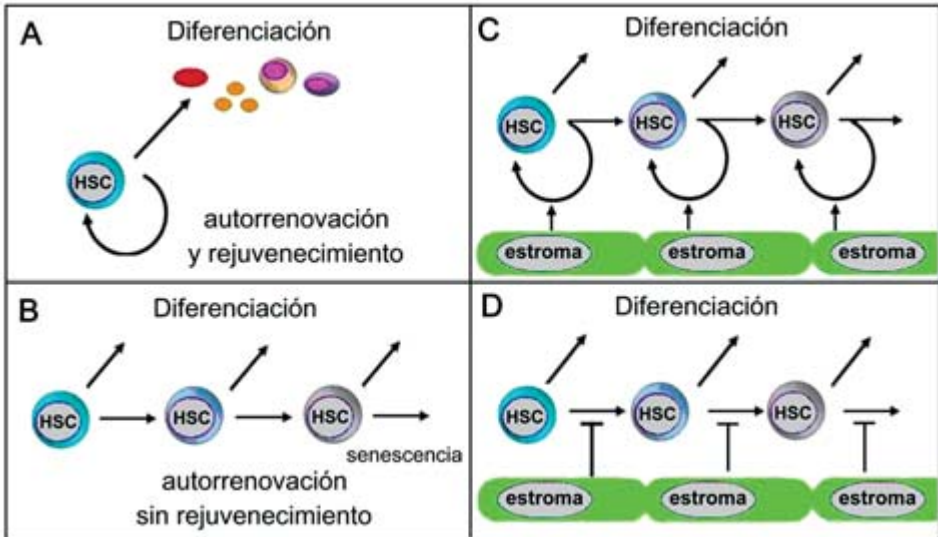


FIGURA 4. **Mecanismos implicados en el envejecimiento de las HSC.** (A) La autorrenovación de las HSC puede estar asociada con el rejuvenecimiento, para evitar de este modo el envejecimiento celular en células madre adultas. (B) Alternativamente las HSC pueden estar ligadas a la senescencia replicativa con un número limitado de divisiones tal como cualquier célula somática. (C) El envejecimiento de las HSC puede estar también controlado por estímulos externos del microambiente que regulan el rejuvenecimiento de las HSC. (D) El anclaje de las HSC a nichos específicos en la médula ósea parece mantenerlas en un estado quiescente y por tanto, la interacción con el microambiente puede contrarrestar la senescencia replicativa de las HSC (Wagner et al., 2008, modificado) (12).

daderas y células progenitoras. Además, la demostración que la célula hija comparte las mismas características de su madre, no es posible debido al hecho que la madre ya no existe después de la división celular. De esta manera, la teoría del rejuvenecimiento infinito de las HSC como se observa en las células madre de la línea germinal o en las células madre embrionarias (ESC) no puede apenas ser verificado (12).

Las HSC sufren el envejecimiento celular. En contraposición con la tesis anteriormente mencionada, las HSC pueden sufrir la senescencia replicativa tal como todas las células de mamíferos. En este caso, no hay autorrenovación «verdadera» ya que las células hijas pueden tener el mismo potencial de diferenciación multilínea, pero después de un número limitado de ciclos celulares, la célula hija entrará en estado senescente y saldrá del ciclo proliferativo. Además de las limitaciones ya mencionadas, los análisis de senescencia replicativa de las

HSC son difíciles de realizar por ausencia de protocolos fidedignos de expansión *in vitro* para las primitivas HSC. Para las células madre mesenquimáticas (MSC), los protocolos de expansión en cultivo están establecidos y se ha demostrado que la senescencia replicativa en estas células es un proceso continuo y organizado. Sin embargo, las MSC son poco definidas a nivel molecular y la verificación de su función como células madre no está del todo demostrada. El agotamiento del reservorio de las HSC no suele ocurrir durante la vida del organismo. Experimentos de trasplante en modelos murinos han demostrado que la menor capacidad de repoblación y el agotamiento de las HSC pueden prolongarse más allá de cinco rondas de trasplante. A pesar de su notable capacidad proliferativa, estos resultados ponen en evidencia que las HSC envejecen. Modelos matemáticos de diferenciación de las HSC demuestran que la hipótesis de Hayflick es compatible con la larga vida de la hematopoyesis. La senescencia replicativa en las HSC está apoyada indirectamente por el hecho de que la mayoría de estas células permanece en estado quiescente en la médula ósea. Se ha demostrado que en la cinética de la división celular asimétrica, una célula hija permanece quiescente o se divide muy lentamente, mientras que la otra se multiplica exponencialmente y genera progenitores comprometidos y colonias de linaje específico. Si las dos células hijas se separan por micromanipulación y se analizan por separado, una de ellas hereda la capacidad de la célula madre, mientras que la otra se vuelve más específica. Analizando las diferencias cinéticas de división para separar las células CD34+/CD38 en una fracción de división lenta (SDF) y una fracción comprometida de rápida división (FDF), se ha detectado que varios marcadores moleculares asociados con la función primitiva de las células madre están más expresados en las células SDF que en las FDF, lo que explica que tanto la quiescencia como la división lenta son mecanismos protectores durante la replicación del DNA, y que el ritmo de división rápida, quiescencia o división lenta, se debe a la protección de mutaciones durante la replicación del DNA o a la prevención del agotamiento replicativo de las células madre (12, 24).

El envejecimiento celular está regulado por el microambiente. Una serie de estudios han demostrado que la hematopoyesis resulta afectada por el microambiente hematopoyético. Las HSC tienen menor capacidad de hospedarse en sus nichos después de ser trasplantadas en

receptores viejos vs. receptores jóvenes. La adherencia de las HSC a su nicho se modula por alteraciones relacionadas con la edad, ya que los ratones viejos muestran mayor movilización de las HSC en respuesta al factor de crecimiento estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF). Se ha demostrado que la disfunción de los telómeros también ejerce efectos sobre el microambiente hematopoyético. En ratones *knockout* para telomerasa la B-linfopoyesis se altera mientras que la mielopoyesis se eleva. Además, la disfunción de los telómeros y el envejecimiento limita el enraizamiento de las HSC de tipo silvestre trasplantadas. Estos datos proporcionan evidencia de que la función de soporte y el tamaño del nicho sufren modificaciones a medida que transcurre la edad (12).

El microambiente mantiene las HSC en estado quiescente para prevenir la senescencia replicativa. Las HSC en condiciones normales, se mantienen en estado quiescente y tienen que ser activadas para generar células sanguíneas, de acuerdo con las necesidades fisiológicas del organismo. Esto ocurre especialmente después de la quimioterapia. La división celular, la autorrenovación y la diferenciación de las células madre están estrictamente controladas por el nicho. Manteniendo las células madre en un estado quiescente se reduce el número de mutaciones que podrían, en sus últimas consecuencias, conducir al desarrollo de leucemia. Por otra parte, esto puede retrasar el agotamiento de las primitivas HSC por senescencia replicativa. Si las HSC sufren la senescencia replicativa, entonces el envejecimiento se modula indirectamente por estímulo externo del nicho que regula su proliferación (12).

Como ya se mencionó, existen numerosos datos que demuestran que el microambiente ejerce influencia sobre el envejecimiento de las HSC, aunque los mecanismos moleculares precisos no se conocen en su totalidad. Se han descrito, recientemente, varios efectores del envejecimiento y alguno de ellos puede estar sometido a control externo por el nicho. Entre los diversos cambios de la hematopoyesis relacionados con la edad, que son el resultado de las alteraciones intrínsecas en las mismas HSC, como también del microambiente hematopoyético que regula y mantiene su función, cabe citar, a las especies reactivas de oxígeno y compuestos tóxicos, la regulación de la expresión génica y del miRNA, modificaciones epigenéticas, la regulación de la proliferación por reposo proliferativo (quiescencia), la regulación de cascadas señalizadoras que

implican la expresión de genes supresores de tumores (*p53*, *p16INK4a* y *p19ARF*) y también la adhesión de las HSC al tamaño limitado del nicho (12, 24).

ESTRÉS REPLICATIVO

La evidencia sugiere que el inevitable daño al DNA asociado a la replicación, conduce al agotamiento replicativo y a la degeneración de la homeostasis tisular típicos de la edad. Por tanto, la replicación del DNA representa una fase precaria en la proliferación celular, que influye en la renovación del tejido. El declinar de la capacidad regenerativa depende en parte de la respuesta apoptótica y de los efectores reguladores del ciclo celular al daño al DNA tales como *p16INK4a*, *p53* y *p21*. Parece ser que los efectos del estrés replicativo son más potentes en aquellas células que llevan consigo el mayor peso en la renovación del tejido, que son las células madre adultas y las células progenitoras. El reservorio de células madre adultas se genera y determina durante el desarrollo, formando cada tejido y sus compartimentos subtisulares por medio de la autorrenovación. Sin embargo, en el curso de renovación a largo plazo, las mutaciones asociadas a la replicación en esas células y en aquellas que mantienen el nicho, causan alteraciones estocásticas en la regeneración tisular (16, 28).

La replicación del DNA es el tendón de Aquiles en el mantenimiento del genoma. Según la segunda ley de la termodinámica, la tendencia de los sistemas ordenados para caer en desorden general, puede aplicarse a todas las moléculas, incluyendo al DNA. Los eventos que ocurren durante la replicación normal del DNA crean en el transcurso del tiempo, suficiente daño al DNA, como para causar la pérdida de células madre y células progenitoras, lo cual va a disminuir la capacidad renovadora del tejido (Figura 5). El proceso de replicación del DNA requiere varios grupos de genes de reparación y el continuo chequeo de los puntos de control esenciales para salvaguardar el genoma durante la replicación. La inestabilidad de la horquilla de replicación, es un evento relativamente común en el curso de la replicación del DNA. Por ejemplo, la fosforilación de H2AX, una variante de histona en respuesta a la rotura de la doble cadena, se estimula una vez que el DNA entra en replicación en células en cultivo (28).

Otras proteínas que responden a la rotura de la doble cadena, tales como Rad51 y BRCA1, son también reclutadas hacia la cromatina durante la fase S, como índice de daño al DNA. Se sabe que el intercambio de las cromátidas hermanas, un marcador de la recombinación homóloga, ocurre a un ritmo de 10 intercambios cada fase S en células en cultivo. Debido a la naturaleza multivariable de los intermediarios de la resolución de la recombinación, 10 intercambios por fase S, proporciona un límite más bajo que el ritmo de recombinación actual durante la síntesis del DNA. Estos eventos de intercambio son un índice del colapso de la horquilla de replicación en escenarios de reiniciación. Finalmente es importante destacar que son esenciales un gran número de genes para el desarrollo embrionario y la proliferación a largo plazo en cultivo, lo que indica la importancia del daño exógeno al DNA. La pérdida de la integridad genómica durante la síntesis del DNA puede afectar la capacidad regenerativa del tejido al iniciar prolongadas respuestas en los puntos de control del ciclo celular, que causan la pérdida funcional de las células madre y las progenitoras (28).



FIGURA 5. El daño al DNA no reparado en el curso de la replicación, inicia respuestas en los puntos de control que conducen a la senescencia o muerte celulares. La proliferación y diferenciación de las células madre y las progenitoras actúan como un medio de reconstituir tejidos afectados, después de la eliminación y muerte de estas células mutantes. Sin embargo, el daño replicativo al DNA, tanto en células madre como en células que forman el nicho, altera las propiedades multipotentes de estas células o causa su pérdida a partir del reservorio proliferativo. Estos deterioros cíclicos proporcionan, con el tiempo, una causa potencial que produce el declinar regenerativo del envejecimiento (Ruzankina et al, 2008) (28).

MECANISMOS REGULADORES QUE INTERVIENEN EN EL ENVEJECIMIENTO DE LAS CÉLULAS MADRE

Los mecanismos implicados en la transición de las células madre hacia el estado senescente se han estudiado en células madre aisladas y purificadas de ratones jóvenes y viejos. Tales estudios han implicado genes que intervienen en la remodelación de la cromatina.

Acompañando al envejecimiento, se registra una menor capacidad para responder al estrés, tanto a nivel de los tejidos, como del organismo completo. La asociación de estas características con las funciones básicas de las células madre ha sido hasta el momento indirecta y de bases moleculares desconocidas; sin embargo, recientemente se ha demostrado que los inhibidores de las quinasas dependientes de ciclina (CDK) juegan un papel importante en la regulación de la función de las células madre durante el envejecimiento, entre los que se encuentran los genes que se integran en el *locus INK4a/ARF* que codifican dos proteínas supresoras tumorales (29, 31).

La evidencia más convincente del modelo de envejecimiento producido por supresores tumorales, la proporciona la proteína supresora tumoral p16INK4a, un efector muy poderoso que frena el ciclo celular y juega un papel importante en la senescencia *in vitro* en distintos tipos celulares (32). La expresión de p16INK4a se eleva de manera notable con la edad en la mayoría de los tejidos de mamíferos (6). En poblaciones de células madre en cerebro y en médula ósea, la expresión de p16INK4a media una disminución en la función replicativa que se debe, tanto a la deficiencia en Bmi-1 (un represor de la expresión *INK4a/ARF*), como a agresiones del tipo de la radiación ionizante. Los ratones que carecen del gen *p16Ink4A* mantienen la función replicativa de las células madre neurales, de las hematopoyéticas y de las β pancreáticas durante el envejecimiento (30). Se ha demostrado también, que la pérdida de *p16Ink4a* atenúa muchos fenotipos relacionados con la edad en una cepa progeroide de ratón que envejece prematuramente (33). Por tanto, la expresión de este gen supresor, no sólo se relaciona con el envejecimiento en estos tejidos, sino que también es causa del aspecto envejecido. La demostración de este modelo, en humanos ha surgido de estudios que asocian los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), cerca del locus *INK4/ARF*, con diversas condiciones asociadas a la edad,

como la diabetes tipo 2, aterosclerosis y el denominado síndrome de fragilidad (6).

Se han generado diferentes cepas de ratón con alteraciones en el *locus* murino *Ink4/Arf* que codifica p16INK4a y otras dos proteínas supresoras de tumores p15INK4b y p19ARF (32). Estos animales sorprenden por ser normales en el estado adulto joven. Los ratones que carecen de los genes *p16Ink4a*, *p19Arf* y *p15Ink4b*, solos o en combinación, son viables, fértiles y no se distinguen de sus congéneres tipo silvestre, hasta que desarrollan tumores. Esta observación sugiere que el *locus* *INK4/ARF* y, en particular el gen *p16Ink4a* no es indispensable en el desarrollo de la mayoría de los tejidos, pero juega un papel importante a lo largo de la vida en la supresión tumoral. Este poderoso *locus* parece que se activa en las etapas tempranas de la progresión neoplásica. Sin embargo, en tanto en cuanto las células activan la expresión de *INK4/ARF*, pierden su capacidad para proliferar. Por tanto, este efecto beneficioso supresor del cáncer, contribuye también a la pérdida de células madre funcionales con la edad.

Si la función principal del gen *p16Ink4a*, y quizás de los otros miembros del *locus* *INK4/ARF* es sofocar la hiperproliferación de células normales que estocásticamente se han alterado, se deduce que la expresión de tal *locus* ha de estar cuidadosamente controlada. En particular, la regulación de la expresión de *INK4/ARF* durante el desarrollo embrionario ha de ser crucial. Muchos tejidos en desarrollo muestran ritmos de proliferación increíbles, que se acoplan con migración celular y cambios rápidos en el medio extracelular. ¿Cómo puede conocer una célula que estos eventos programados del desarrollo, que comparten muchos rasgos del crecimiento maligno aberrante, son normales y no causan activación del *locus* *INK4/ARF*? La evidencia sugiere que, en mamíferos adultos, este problema está dirigido por mecanismos poderosos que silencian el *locus* hasta que se deja de reprimir por activación inducida por la edad del gen *p16Ink4a*. Sin embargo, no está claro el mecanismo de regulación del *locus* *INK4a/ARF* durante la embriogénesis y los estadios tempranos del neonato.

HMGA2 REGULA EL LOCUS INK4A/ARF
EN CÉLULAS MADRE

Un reciente estudio de Nishino *et al.* (34) identifica a HMGA2, proteína no histona, asociada a la cromatina, como un regulador de la autorrenovación de las células madre y de la expresión de *Ink4a/Arf* en ratón. Estos autores han estudiado los transcritos que se expresan de manera destacada en células madre fetales, pero cuya expresión disminuye después del nacimiento y en la vejez. Se ha identificado un transcrito, el *Hmga2*, que satisface este criterio y muestra una expresión disminuida en células madre hematopoyéticas y en dos tipos de células madre neurales. Existen cuatro proteínas de la familia del grupo A de elevada movilidad (HMGA): tres son isoformas de HMGA1 y HMGA2. Estas proteínas asociadas a la cromatina parecen que carecen de actividad transcripcional intrínseca, pero, en vez de eso, se unen a secuencias de DNA ricas en AT y potencian los efectos de factores transcripcionales alterando la estructura local de la cromatina (35). Los ratones que sobreexpresan *Hmga2* generan tumores linfoides, lipoides y pituitarios. En humanos, las amplificaciones genéticas o traslocaciones de gen *Hmga2* que aumentan su expresión, se asocian con una variedad de tumores comunes benignos mesenquimáticos, y también con cánceres agresivos raros (35).

Estos autores (34) muestran que la proteína HMGA2 juega un papel asociado al envejecimiento en la autorrenovación de las células madre neurales de ratón (NSC). Aunque HMGA2 no parece que se requiera para la generación de las NSC durante el desarrollo fetal, las NSC de ratones deficientes en el gen *Hmga2* tienen defectos de proliferación y autorrenovación. La diferenciación de los progenitores neurales de estos ratones no exhibe deficiencias proliferativas, lo que sugiere que la pérdida del gen *Hmga2* no conduce a un descenso global de la replicación celular, pero afecta específicamente la autorrenovación. De acuerdo con el patrón de expresión observado del gen *Hmga2*, es necesario destacar que los efectos negativos de la proteína HMGA2 sobre la proliferación son más pronunciados en las NSC procedentes de embriones tardíos o ratones muy jóvenes y que estos efectos declinan en el envejecimiento. De hecho, el número y función de las NSC son similares en ratones viejos deficientes en el gen *Hmga2* que en sus congéneres silvestres, lo que indica que el envejecimiento fisiológico de los ratones normales

reduce la función de las NSC hacia un valor comparable al que se establece durante el desarrollo en ratones deficientes en el gen *Hmga2*. Las alteraciones en la función de las células madre en ratones jóvenes deficientes en *Hmga2* se asocian con cambios neuroanatómicos, entre los que cabe citar, menor proliferación celular en la zona subventricular, que es donde residen las NSC, y menor número de neuronas en los sistemas nerviosos central y periférico.

Cuando se analizó la expresión de los genes *p16INK4a* y *p19Arf* en NSC de ratones carentes del gen *Hmga2*, se encontró que las células madre de los embriones a término y las de ratones jóvenes sobreexpresaban de manera notable ambos genes del locus *Ink4a/Arf*. Por tanto, el grado de expresión de *Ink4a/Arf* se relaciona de manera inversa con el de *Hmga2* desde la vida fetal a término hasta la vejez, lo que sugiere una conexión indirecta entre este locus y HMGA2. Por tanto, las deficiencias en la autorrenovación de NSC de ratones deficientes en *Hmga2*, pueden ser recuperadas parcialmente por la pérdida de la expresión de los genes *p16Ink4a* o *p19Arf*. La sobreexpresión de estos genes es más pronunciada en los embriones a término y en ratones muy jóvenes, pero disminuye con la edad. Como la expresión de *Ink4a/Arf* se eleva normalmente en las NSC con la edad, los ratones silvestres parece que se igualan con los ratones deficientes en *Hmga2* respecto a la expresión de *Ink4a/Arf*. La expresión de los genes *p16INK4a* y *p19Arf* es comparable en las NSC de ratones mutantes viejos (2 años) y silvestres, lo que indica que los efectos de HMGA2 son más pronunciados desde los fetos a término hasta jóvenes adultos. Como no ha podido detectarse ninguna unión de HMGA2 al locus *Ink4a/Arf*, Nishino *et al.* (34) sugieren que HMGA2 puede controlar la expresión desde este locus, reprimiendo la expresión de *JunB*, un activador de la expresión de *Ink4a/Arf* en células madre.

TELOMERASA EN LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS

Las células madre adultas o somáticas son la fuente regeneradora de los distintos tejidos del organismo. Se ponen en acción cuando se produce un daño tisular y emigran desde sus nichos hasta el lugar que tienen que reparar o restaurar. Sin embargo, si se multiplican en exceso, o demasiado poco, pueden ser origen de cáncer o de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, respectivamente (Figura 6).

Uno de los eventos intrínsecos más conocidos de la célula, propuesto por Harley *et al.*, en 1990 (36), que mejor describe el mecanismo implicado en el envejecimiento celular, es el acortamiento de los telómeros en cada ronda de división celular. El ritmo al cual los telómeros se acortan con la edad es muy variable y puede ser influenciado por factores que se aceleran por la edad y son un riesgo de muerte prematura. El acortamiento de los telómeros se acelera también en varias enfermedades humanas típicas de la vejez, tales como la enfermedad cardiovascular y la infección entre otras. Existe una correlación entre la longitud de los telómeros y el riesgo de muerte por enfermedad cardíaca. También la longitud de los telómeros es un marcador predictivo de demencia o alteraciones cognitivas (37, 39).

Recientemente, se ha descubierto que el comportamiento de las células madre está determinado por sus telómeros y la cantidad de telomerasa que contienen. Los telómeros y la telomerasa son determinantes importantes de la mortalidad e inmortalidad celular y uno de los mecanismos mejor conocidos que controlan el cáncer y el envejecimiento (37). Mantener los extremos de los cromosomas o telómeros en buen estado permite que las células madre funcionen eficazmente. Las células madre epiteliales cuando tienen telómeros muy cortos no abandonan sus nichos ni regeneran la piel y el pelo adecuadamente, por lo que provocan el envejecimiento prematuro de la piel. Por el contrario, cuando la proteína encargada de alargar los telómeros, la telomerasa, se encuentra en exceso en las células, lo que ocurre en más del 90% de los tumores, las células madre epiteliales abandonan en exceso sus nichos para regenerar los tejidos, con lo que la piel y el pelo crecen más de lo que es normal, provocando mayor susceptibilidad de formar tumores epiteliales (Figura 6) (37). Estos descubrimientos indican que la longitud telomérica y la cantidad de telomerasa determinan el comportamiento de las células madre. Los defectos en la longitud de los telómeros de las células madre preceden en el tiempo a la aparición de los primeros síntomas visibles de envejecimiento prematuro o del cáncer, por lo que la medida de la longitud telomérica o de actividad de la telomerasa en células madre puede considerarse uno de los parámetros utilizables en el pronóstico. Las terapias que permitiesen controlar estas variables en las células madre podrían ser beneficiosas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el envejecimiento, incluyendo el cáncer. Desvelar los parámetros que

determinan los defectos en la función de las células madre es esencial para el establecimiento de posibles terapias celulares sin causar efectos secundarios indeseables. Tales defectos son: el acumulo de errores en la maquinaria de replicación, cambios en la fluidez de la membrana, daños por la acción de las ROS, aumento de los productos de glicosilación avanzada, resistencia a la insulina, reducción de la longitud de los telómeros, autoinmunidad y apoptosis (37, 38).

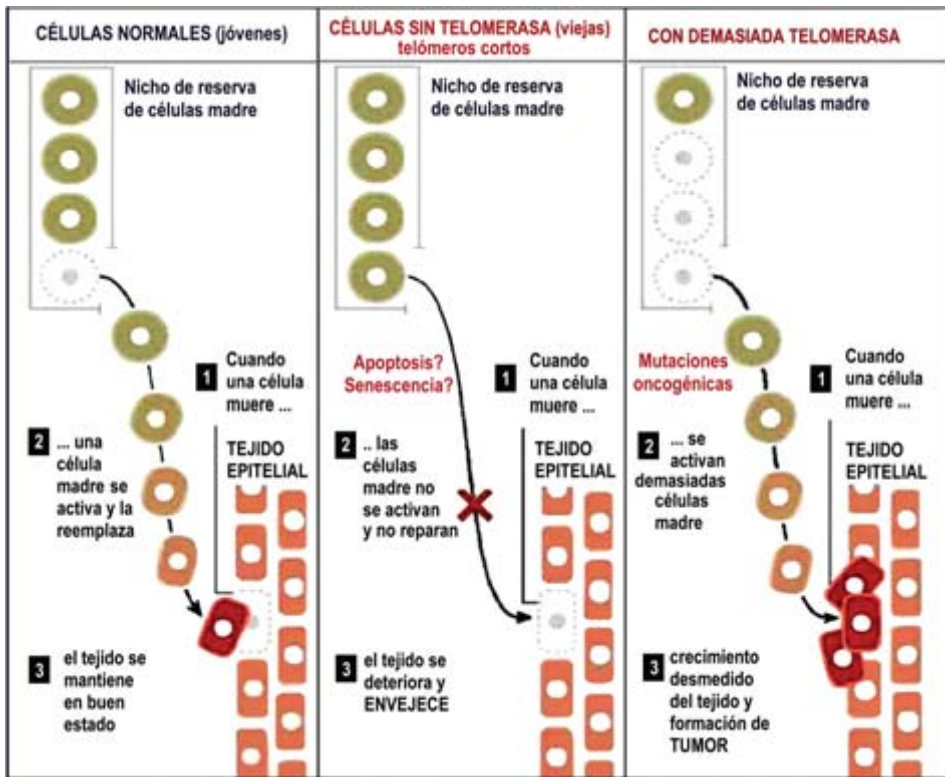


FIGURA 6. **Papel de la telomerasa en el funcionamiento de las células madre, que conduce al envejecimiento o al cáncer.** El acortamiento de los telómeros (en células sin telomerasa) conduce a menor capacidad de las células madre a abandonar el nicho y regenerar los tejidos, con lo cual el tejido se deteriora y envejece. Los mecanismos que intervienen en esta menor movilización no están claros, pero es probable que se deban a la senescencia y apoptosis en respuesta a los telómeros cortos. Por el contrario, la sobreexpresión de telomerasa conduce a una aberrante movilización de las células madre fuera del nicho, la cual, en combinación con mutaciones oncogénicas, puede contribuir a la formación de tumor. (Blasco 2008, con modificaciones) (37).

Los telómeros se alargan por la acción catalítica de la telomerasa, pero en ausencia de este enzima tiene lugar un persistente acortamiento de los telómeros y finalmente la pérdida de la función de dichos telómeros, que se asocia con senescencia replicativa y apoptosis. Las células madre normalmente expresan la telomerasa en contraste con la mayoría de las células somáticas. Sin embargo, en las HSC, la actividad telomerasa es baja, aunque suficiente como para mantener los telómeros durante el envejecimiento limitando su vida proliferativa. Por otro lado, en un modelo de trasplante seriado en ratón con sobreexpresión de telomerasa, las HSC de animales transgénicos y no transgénicos no pudieron ser trasplantados más de cuatro veces, lo que indica que otros mecanismos, que no son la telomerasa, limitan también la función de las células madre. Además, la disfunción de los telómeros altera también el nicho de las células madre. Utilizando ratones *knockout* en telomerasa (*Terc*^{-/-}), se ha demostrado que la falta de telomerasa induce alteraciones en el microambiente de la médula ósea, por disminuir el compartimento de las células del estroma y reducir la capacidad de las células de la médula ósea en su actividad de soporte de la hematopoyesis. La actividad de soporte hematopoyético depende de la edad y se relaciona con el progresivo acortamiento de telómeros en estas células estromales. Además, la disfunción de los telómeros altera la expresión de varias citoquinas en plasma de los ratones viejos *Terc*^{-/-} antes citados. Estos datos proporcionan evidencia clara, que el acortamiento de los telómeros no es el único mecanismo intrínseco implicado en el envejecimiento celular de las HSC, aunque la pérdida de telómeros induce alteraciones asociadas a la edad en el ambiente de las células madre que pueden alterar la función y el enraizamiento de las HSC en casos de trasplante (37, 39).

La longitud de los telómeros se ha demostrado que está controlada por mecanismos epigenéticos. El mantenimiento y elongación de los telómeros mediado por la telomerasa dependen en gran parte de la estructura del telómero, y está regulada por proteínas de unión al telómero y por modificaciones de la cromatina a nivel de los propios telómeros. Los telómeros muestran modificaciones en las histonas características de los dominios heterocromáticos y de cromatina silenciada, tales como la trimetilación de H3K9 y H3K20 y la unión de la proteína de unión a la doble cadena (HP1) (40, 41).

Algunos síndromes humanos se caracterizan por mutaciones en los genes de la telomerasa que ocasionan ritmos acelerados de acortamiento de los telómeros. Estas enfermedades son, algunos casos de disqueratosis congénita, anemia aplásica, y fibrosis pulmonar idiopática. En particular, los pacientes con disqueratosis congénita acarrean mutaciones en componentes del complejo de la telomerasa que producen una estabilidad disminuída de la telomerasa y telómeros más cortos. Estas mutaciones afectan a los genes *Terc* y *Tert* (en pacientes con disqueratosis dominante congénita) o al gen de la disqueratosis congénita 1 (*DKC1*) (en pacientes con la forma ligada a X de la enfermedad), los cuales codifican una telomerasa que interacciona con proteínas implicadas en la estabilidad de *Terc* y en el procesamiento del RNA nuclear pequeño. Ambas mutaciones dan como resultado una actividad telomerasa muy disminuida y telómeros muy cortos. Sorprendentemente, los pacientes con disqueratosis congénita desarrollan muchas de las patologías demostradas en el modelo de ratones deficiente en *Terc*^{-/-}, tales como corta estatura, hipogonadismo e infertilidad, defectos en la piel y en el sistema hematopoyético, fallo en la médula ósea y muerte prematura. Al igual que en ratones deficientes en *Terc*, los pacientes con disqueratosis congénita también muestran inestabilidad cromosómica con el envejecimiento, lo cual está de acuerdo con una velocidad mayor de pérdida de los telómeros.

FISIOPATOLOGÍA DEL ENVEJECIMIENTO Y TERAPIA REGENERATIVA

Muchas de las situaciones patológicas que afligen al anciano, anemia, sarcopenia, osteoporosis, etc, derivan de una alteración entre la pérdida y la renovación celular. El hecho de que el mantenimiento homeostático y el potencial regenerativo de los tejidos decaigan a medida que transcurre la vida, ha implicado el declinar de las células madre como hecho crucial en el complejo proceso del envejecimiento. Es un hecho reconocido que la edad avanzada va acompañada, además, por mayor riesgo de cáncer. Como el cáncer surge después de la adquisición de múltiples eventos mutagénicos, las células de larga vida son las que están más propensas para acumular dichas mutaciones. Así, las células madre son los objetivos ideales para el acumulo de daño precanceroso, ya que las propiedades que caracterizan a estas células, autorrenovación y diferenciación, las

capacita para mantener y propagar las mutaciones adquiridas en el transcurso del tiempo, tanto en la progenie autorrenovable como en los progenitores más diferenciados durante la vida del organismo (42).

El peligro del acúmulo de mutaciones en las células madre tiene su contrapartida en la acción de las proteínas supresoras de tumores, que suprimen los clones malignos mediante la apoptosis o parada del crecimiento. Sin embargo, como las demandas homeostáticas de los tejidos requieren la actividad de las células madre y de las células progenitoras, estos supresores tumorales pueden, sin advertirlo, conducir al descenso de actividad de las células madre, contribuyendo así al envejecimiento.

El cáncer es la causa conductora de muerte en individuos de edad avanzada, y a pesar de la plétora de nuevas terapias anticáncer en los últimos diez años, la muerte ha descendido solo un 1,5% por año. Como la multiplicidad de eventos moleculares que se corresponden con el envejecimiento ocurren también en tumores, los estudios para elucidar las aberraciones moleculares en células madre y progenitoras durante la vejez, puede proporcionar la forma de aumentar el conocimiento en la formación del cáncer y dirigirlo hacia el diseño de nuevas terapias. Muchos cánceres, incluyendo el de colon, mama, cerebro, cabeza y cuello del útero, pancreático y hematopoyéticos, contienen poblaciones pequeñas de células iniciadoras de tumores o células madre cancerosas (CSC) (1, 42). Las CSC comparten muchas de sus propiedades funcionales con las células madre normales, incluyendo el potencial ilimitado de autorrenovación. Al igual que las células madre normales, las CSC tienen el potencial de hacer surgir la mayoría de los tipos celulares tumorales y son, en sus últimas causas, las responsables del mantenimiento continuo del tumor. Además las CSC, como las células madre normales, expresan elevados niveles de proteínas transportadoras de multirresistencia a fármacos, ABC/MDR que median el eflujo de los fármacos, una propiedad que las capacita a evadir el efecto de la quimioterapia, y contribuye a la recaída. De hecho, la causa conductora de la muerte en pacientes con cáncer continúa siendo la resistencia, intrínseca o la adquirida, de las células tumorales a la terapia. El grado en el cual las CSC derivan directamente de las células madre normales o transformadas, o son el resultado de eventos transformantes que imparten propiedades de células madre a progenitores comprometidos, es probable que sea variable entre los diferentes cánceres, aunque están

implicadas las aberraciones en los mecanismos que gobiernan la autorrenovación y la supervivencia y las decisiones del destino celular, ya que estos son procesos normales estrictamente regulados.

Una de las enfermedades más estudiadas que demuestra la correlación entre el envejecimiento de las células madre y la adquisición de mutaciones requeridas para la transformación maligna es la leucemia mieloide crónica (CML), la cual es, en general, enfermedad de ancianos. La CML fue el primer tumor maligno asociado con anormalidad cromosómica y su tirosina quinasa constitutivamente activa, es el producto de la fusión *BCR/ABL*. La CML fue también el primer cáncer que se demostró que derivaba de una célula madre y que fue tratado terapéuticamente con un fármaco diseñado para inhibir la expresión de la oncoproteína *BCR/ABL* (1, 43). Los mecanismos moleculares que conducen a la progresión de la CML humana, desde su fase crónica hasta la crisis mieloide blástica, han sido ya muy estudiados, pero solo recientemente ha sido evaluado el papel de las células madre y las progenitoras. En la fase crónica se ha demostrado que el transcrito de fusión *BCR/ABL*, estaba presente a elevados niveles en las HSC fenotípicas, mientras que el estado de crisis blástica fue caracterizado por la expresión amplificada de *BCR/ABL* en progenitores de granulocitos/macrófagos comprometidos (GMP). Después de la transición de la crisis blástica se encontró que los GMP habían ganado la capacidad de autorrenovación y de transferir la crisis blástica a ratones inmunodeficientes, en parte, como consecuencia de la adquisición de la autorrenovación que fue conseguida a través de la vía de señalización de la Wnt/ β catenina, lo cual demuestra la formación de células madre leucémicas (LSC) (1, 44).

Estos y otros muchos estudios refuerzan la importancia de los mecanismos intrínsecos y extrínsecos que establecen un puente entre la regulación de las células madre normales y leucémicas. Esclarecer estos mecanismos ha de aportar más información sobre estrategias de diagnóstico y pronóstico, así como proporcionar vías para el desarrollo de nuevas terapias.

La consideración de la terapia regenerativa en su aplicación a las enfermedades relacionadas con la edad, ha atraído la atención hacia dos categorías de células madre: las células madre adultas, específicas de tejidos y las células madre embrionarias. El establecimiento de las células madre embrionarias (ESC) por Thompson en 1998 (45), ha promo-

vido el entusiasmo de los investigadores relacionados con este campo, hacia el estudio de las células madre. Existen diferencias entre estos dos tipos celulares con respecto a su potencial terapéutico: las ESC tienen un potencial ilimitado para el crecimiento y diferenciación, mientras que las células madre adultas están dirigidas hacia la especialización. Así, las células madre adultas tienen la capacidad de regenerar los tejidos en los cuales ellas se encuentran durante la vida de un individuo, mientras que las ESC tienen el potencial de formar la mayoría de los tipos celulares del organismo adulto por un casi ilimitado período de tiempo. Sobre la base de modelos animales, varios estudios han afirmado que las células madre adultas pueden también desarrollar un potencial comparable al de las células madre embrionarias (46). Estudios más recientes, sin embargo, han cuestionado la interpretación de los resultados iniciales que sugieren la plasticidad o transdiferenciación de las células madre adultas (47). Mientras que alguno de los experimentos que demostraban la versatilidad de las células madre adultas, no fueron reproducibles, otros estudios detectaron, tanto *in vitro* como *in vivo*, fusiones espontáneas de células y núcleos entre células madre adultas y células diferenciadas del organismo.

La fusión celular puede, por tanto, explicar el fenómeno que se ha interpretado como evidencia de transdiferenciación, aunque otros estudios han demostrado que la transdiferenciación se verifica sin fusión celular, especialmente en condiciones fisiológicas del feto en desarrollo, aunque a frecuencia muy baja (48). Además, al contrario a las ESC, que pueden derivar de líneas celulares establecidas desde los 4 a los 7 días del embrión, las células madre adultas son evasivas. Para tratar la leucemia, son necesarios ensayos *in vitro* para identificar si los progenitores hematopoyéticos humanos se incrementan con el advenimiento del trasplante de tejido hematopoyético. Cualquier ensayo para evaluar células madre adultas ha de comparar las propiedades de las células analizadas *in vitro* con aquellas de unidades de repoblación probadas *in vivo* después de una dosis letal de irradiación. Este modelo experimental no es posible en humanos (46). Para poner a prueba las células madre adultas, se han desarrollado ensayos de colonias, incluyendo los de células iniciadas a largo plazo (LTC-IC) y ensayos de células iniciadas mieloides-linfoideas, que pueden servir como marcadores para la repoblación potencial de las células madre en una población dada (46). Además, se ha demostrado que los marcadores de superficie tales como

CD34, CD133, Thy-1 y HLA-DR, se asocian con la cualidad de células madre de las preparaciones celulares. A pesar de todos los esfuerzos realizados durante los últimos años, ningún ensayo se considera adecuado para identificar las HSC. Así que, no existe sustituto apropiado para ensayos de repoblación en un modelo de trasplante de ratón, después de una dosis letal de irradiación. Un modelo de ratón inmunocomprometido, tal como el modelo SCID, o modelos de trasplante *in utero* de oveja, usando animales tolerantes a las HSC humanas, han sido propuestos para estimar los potenciales de repoblación de las HSC humanas (49).

El impacto del tiempo y la edad en la cantidad y calidad de las HSC de ratón han sido estudiados, pero la información sobre la senescencia en HSC humanas es escasa. Este estudio es de gran importancia porque estas células mantienen su función durante más tiempo que el promedio de la vida humana. La mayor parte del conocimiento que se ha conseguido acerca de la senescencia de las células madre ha sido a través de estudios en ratones, ya que estos animales comparten más del 90% de su genoma con el humano y tienen 30 veces más corta la vida, por lo que se espera que las observaciones en el comportamiento de las células madre en ratón, puedan ser extrapoladas a las HSC de humano. Varios estudios han indicado que incluso pensando en concentraciones similares de HSC, que se encuentran en médula ósea joven y vieja, la capacidad funcional por célula en el modelo de repoblación es lo que muestra una reducción significativa dependiente de la edad del donante, y que la senescencia de las HSC se regula por varios elementos genéticos ubicados en cromosomas específicos (50). Estos elementos pueden diferir entre las especies, razas e incluso en individuos en el modelo de ratón. En humanos, la senescencia de las HSC y sus efectos patológicos relacionados, pueden no ser tan obvios como en el modelo de ratón porque los clones de HSC primitivos pueden producir progenie que soporte la producción de células sanguíneas maduras a lo largo de la vida, lo cual está claro después del trasplante de médula ósea o de HSC. El potencial terapéutico de los tratamientos basados en células madre fue demostrado por primera vez en los últimos 1960 (51, 52), cuando se utilizó el trasplante de médula ósea para tratar pacientes con inmunodeficiencia hereditaria o con leucemia aguda. Sin las ventajas del conocimiento actual de inmunología y los cuidados de apoyo, las tasas de morbilidad y mortalidad eran altas. Sin embargo, los resultados fueron estimulantes comparados con aquellos obtenidos a partir de opciones de

tratamiento convencional. El trasplante de médula ósea ha llegado a ser mucho más eficiente y se ha comprobado que es la única posibilidad de cura para algunos pacientes con enfermedades hereditarias y malignas. Aunque inicialmente identificadas en la médula, las HSC fueron posteriormente encontradas en sangre periférica después de estimulación durante la fase de recuperación de terapia mielosupresora o de la administración de citoquinas. Estas HSC de sangre periférica han sido trasplantadas con éxito en lugar de la médula ósea para reconstituir las funciones hematopoyéticas e inmunes en los receptores (46).

Encontrar medios para reactivar las células madre y controlar su destino ha de crear oportunidades impredecibles para la curación de enfermedades degenerativas. Las células madre son enormemente prometedoras para terapias de reemplazo celular o reparación de tejidos, en muchas enfermedades degenerativas del envejecimiento, ictus, enfermedad cardíaca, diabetes y enfermedad de Parkinson. Considerando el tiempo y la edad, la investigación con células madre es importante por dos razones: primera, porque supone un buen modelo para estudiar el envejecimiento y segunda, porque los cambios asociados con la senescencia de células derivadas de la médula ósea, puede proporcionar pistas pertinentes para descifrar el proceso de envejecimiento celular. Por otra parte, encontrar caminos para reactivar las células madre y controlar sus destinos puede crear oportunidades imprevistas para curar enfermedades.

Todas las células del organismo poseen un repertorio de unos 30.000 a 40.000 genes de los cuales en cualquier momento solo una cuarta parte se expresa. Las bases fundamentales de las diferencias en los diferentes tipos de células (corazón, cerebro, hígado, piel, etc), que comprenden el organismo, se encuentran en la decisión celular de qué genes expresa o reprime. Durante el desarrollo fetal, las células madre embrionarias con completo acceso al genoma van a dar lugar a la multitud de tipos celulares requeridos para un individuo completo, generando progenies con acceso al genoma cada vez más restringido, las cuales se van comprometiendo a ciertos destinos celulares.

La necesidad de progresar en las terapias de reemplazo de células y órganos es acuciante, en tanto en cuanto la sociedad tiende hacia un aumento de la población con edad avanzada. Está claro, que son muchas las enfermedades que no pueden ser curadas por los fármacos en uso, tales como la diabetes tipo I, enfermedad de Parkinson, fallo

hepático y deterioro de los cartílagos. Para estas enfermedades, la clave del progreso ha de ser la terapia basada en la introducción de células de reemplazo. La meta de hoy es promover la regeneración de los tejidos en casos de enfermedad y de envejecimiento normal. Los progresos en la *Terapia Regenerativa* dependerán de los progresos en la biología de las células madre y requerirán el desarrollo de tecnologías y destreza en el aislamiento, cultivo y manipulación de células con capacidad de diferenciarse en varios tipos celulares. Las recientes investigaciones sugieren que una sola o unas pocas clases de células madre residen en muchos tejidos adultos y que las señales ambientales determinan cómo estas células se diferencian. Será importante determinar cuáles son esas señales. En este aspecto, ya se posee una larga tradición en estudios de biología del desarrollo y diferenciación de células madre embrionarias de ratón.

Se ha demostrado que células de médula ósea de ratón están constantemente migrando al cerebro para producir nuevas células nerviosas. Aunque esto ocurre con muy pocas células, esta observación sugiere la existencia de una vía natural de regeneración del sistema nervioso y puede predecirse un día no lejano, en el que se desarrollen fármacos que estimulen la producción endógena de nuevas células nerviosas a partir de células de la médula ósea (53). Se ha identificado también un gen regulador (factor de transcripción) que opera como un interruptor maestro en las células madre, conduciéndolas para convertirse en neuronas (54, 55). Estudios en células madre del músculo han proporcionado un modelo animal (ratón) para probar terapias de reemplazo celular en distrofias musculares (55). Terapias de ingeniería de reemplazo celular para la restauración de células productoras de insulina, en pacientes con diabetes tipo I, es otro de los retos en la actualidad (56).

CONCLUSIONES

El envejecimiento celular y la senescencia no representan necesariamente un destino inevitable de las células, porque la senescencia celular no se ha observado en organismos primitivos como tampoco en células germinales. El envejecimiento en diferentes especies se relaciona con el tiempo de generación y parece proporcionar una ventaja evolutiva para el total de las especies. Es interesante destacar que este proceso está

restringido a organismos superiores con un mesodermo y nichos de células madre altamente especializados.

Hoy se sabe que el organismo adulto contiene reservorios de células madre residuales, que se parecen a las células primitivas del embrión y que tienen la capacidad de ser instruidas para producir una panoplia de tipos celulares que puedan ser utilizados para beneficio terapéutico. Se están desarrollando con gran rapidez, nuevas tecnologías que permitirán que las células maduras diferenciadas readquieran su capacidad de acceso completo al genoma, y puede vislumbrarse el día, en el futuro cercano, en el que casi cualquier célula podrá reprogramarse para producir células con propiedades de células madre.

Datos recientes sugieren que envejecemos, en parte, porque nuestras células madres autorrenovables envejecen como resultado de acontecimientos intrínsecos. El control extrínseco del nicho juega un papel importantísimo en la regulación del envejecimiento de las células madre y, por tanto, en la regeneración tisular en el organismo viejo. Varios mecanismos moleculares diferentes pueden estar implicados en este control, y se necesitan futuras investigaciones para profundizar en este tema de tanta repercusión fisiológica.

La pérdida de la autorrenovación y las deficiencias en la diferenciación de las células madre son responsables del fenotipo típico del envejecimiento. Los mecanismos moleculares que contribuyen al envejecimiento de las células madre son aquellos implicados en la eliminación por apoptosis o senescencia de las células con daño genético, el cual puede suponer un riesgo para la integridad del organismo. Ambas HSC y MSC están siendo usadas en clínica. Por tanto, el conocimiento del envejecimiento de estos compartimentos de células madre es importante, no sólo desde la perspectiva de la prevención o mejora de las disfunciones asociadas a la edad, sino también para tenerlas en consideración frente a donantes de células madre selectivas para ser utilizadas en terapias celulares. Las HSC son las células madre mejor caracterizadas y se posee un razonable conocimiento del efecto de la edad sobre su capacidad proliferativa y funcional. Esto ha conducido al uso en clínica de las HSC de neonatos, específicamente la sangre del cordón umbilical. Estudios en MSC sugieren que tanto HSC como MSC sufren un declinar en su capacidad de diferenciación y expansión a medida que transcurre la edad del organismo. Sin embargo, el grado de este declinar no está

claro debido a la falta de consenso entre las características fenotípicas, condiciones de crecimiento, y dependencia de los estudios *in vitro* que llevan consigo extensas comparaciones.

ABREVIATURAS

ABC, *ATP binding cassette*, *BRC/ABL*, gen de fusión del cromosoma Filadelfia; CDK, quinasas dependientes de ciclina; CDK2a, *locus* que codifica dos proteínas supresoras de tumores; CML, leucemia mieloide crónica; CSC, células madre cancerosas; ESC, células madre embrionarias; FDF, fracción de células que se divide rápidamente; G-CSF, factor de crecimiento de colonias de granulocitos; H2AX, variante de histona; H3K9, histona 3 metilada en lisina 9; H3K20, histona 3 metilada en lisina 20; HMGA proteína no histona, que se asocia a la cromatina; HP1, proteína que responde a la rotura de la doble cadena; HRP, proteína rica en histidina que se une a los telómeros e incrementa su longitud gradualmente; HSC, células madre hematopoyéticas; LSC, células madre leucémicas; MDR, multirresistencia a fármacos; MSC, células madre mesenquimaáticas; NSC, células madre neurales; Rad51, familia de proteínas que intervienen en la reparación de roturas de la doble cadena; ROS, especies reactivas de oxígeno; SDF, fracción de células que se divide lentamente; SMP, polimorfismo de un solo nucleótido; SOD1, superóxido dismutasa 1; TA, amplificación transitoria; TERC, componente RNA de la telomerasa; TERT, componente proteico de la telomerasa.

AGRADECIMIENTOS

A doña Adoración Urrea Salazar por su inestimable ayuda en la realización de este manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rossi DJ, Jamieson CHM y Weissman IL (2008) Stem cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* **132**, 681-696.
2. Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F y Verfaillie CM (2008) Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res* **314**, 1937-1944.

3. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, *et al.* (2005) Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **102**, 9194-9199.
4. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ *et al.* (2005) Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* **433**, 760-764.
5. Rando TA (2006) Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* **441**, 1080-1086.
6. Sharpless NE y DePinho RA (2007) How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 703-713.
7. Murry CE, Keller G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development *Cell* **132**, 661-680.
8. Rossant J, (2008) Stem cells and early lineage development. *Cell* **132** 527-531.
9. Dorshkind K, Montecino-Rodriguez E, Signer RA (2009) The ageing immune system: is it ever too old to become young again? *Nat Rev Immunol* **9**, 57-62.
10. Verfaillie CM (2002), Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. *Trends Cell Biol.* **12**, 502-508.
11. Wagers AJ, Christensen JL, Weissman IL (2002) Cell fate determination from stem cells. *Gene Ther* **9**, 606-612.
12. Wagner W, Horn P, Bork S y Ho AD (2008) Aging of hematopoietic cells is regulated by the stem cell niche. *Exp Gerontol* **43**, 974-980.
13. Maximow A (1909) Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leber der Säugetiere. *Folia Haematol (Leipzig)* **8**, 125-141.
14. Siminovitch L, McCulloch EA y Till JE (1963) The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *J Cell Physiol* **62**, 327-336.
15. Bapat SA (2007) Evolution of cancer stem cells. *Seminars in Cancer Biol* **17**, 204-213.
16. Liang Y y Zant GV (2008) Aging stem cells, latexin and longevity. *Exp Cell Res* **314**, 1962-1972.
17. Morrison SJ, Wandycz AM, Akashi K, *et al.* (1996) The aging of hematopoietic stem cells. *Nat Med* **2**, 1011-1016.
18. Harman D (1956) Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Nutr* **114**, 411-417.
19. Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* **408**, 239-247.
20. Williams GC (1957) Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* **11**, 398-411.
21. Medawar PB (1952) An unsolved problem of biology (HK Lewis, Londres).
22. Hayflick L, Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* **25**, 585-621.
23. Bellantuomo I y Keith WN (2007) Stem cell ageing: does it happen and can we intervene. *Expert Rev Mol Med* **9**, 1-20.
24. Sudo K, Ema H, Morita Y y Nakauchi H (2000) Age-associated characteristics of murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **192**, 1273-1280.

25. Schofield R (1978) The relationship between the spleen colony-forming cells and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* **4**, 7-25.
26. Tam W-L, Ang Y-S y Lim B (2007) The molecular basis of ageing in stem cells. *Mech Ageing Dev* **128**, 137-148.
27. Morshead CM, Benveniste P, Iscove NN, van der Kooy D (2002) Hematopoietic competence is a rare property of neural stem cells that may depend on genetic and epigenetic alterations. *Nat Med* **8**, 268-273.
28. Ruzankina Y, Asare A y Brown EJ (2008) Replicative stress, stem cell and aging. *Mech Ageing Develop* **29**, 460-466.
29. Janzen V, Forkert R, Fleming HE *et al.* (2006) Stem cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16^{ink4a}. *Nature* **443**, 421-426.
30. Jacobs JJ, Kieboom K, Marino S *et al.* (1999) The oncogene and Polycomb-group gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through ink4a locus. *Nature* **397**, 164-168.
31. Chambers SM, Shaw CA, Gatz C *et al.* (2007) Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol* **5**, e201.
32. Gil J y Peters G (2006) Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 667-677.
33. Baker DJ, Pérez-Terzic C, Jin F *et al.* (2008) Opposing roles for p16Ink4a and p19Arf in senescence and ageing caused by BubR1 insufficiency. *Nat Cell Biol* **10**, 825-836.
34. Nishino J, Kim I, Chada K y Morrison SJ (2008) Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell* **135**, 227-239.
35. Fusco A y Fedele M (2007) Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* **7**, 899-910.
36. Harley CB, Futcher AB y Greider CW (1990) Telomeres shorten during ageing human fibroblasts. *Nature* **345**, 458-460.
37. Blasco MA (2008) Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol* **3**, 640-649.
38. Blasco MA (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Rev Genet* **6**, 611-622.
39. Serrano M y Blasco MA (2007) Cancer and ageing: convergent and divergent mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **8**, 715-722.
40. Flores I, Cayuela ML y Blasco MA (2006) Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 254-260.
41. Gonzalo S, García-Cao M... Blasco MA (2005) Role of RB1 family in stabilizing histone methylation at constitute heterochromatin. *Nat Cell Biol* **7**, 420-428.
42. Clarke MF y Fuller M (2006) Stem Cell and cancer: two faces of eve. *Cell* **124**, 1111-1115.
43. Wong S y Witte ON (2004) The BCR-ABL story: bench to bedside and back. *Annu Rev Immunol* **22**, 247-306.

44. Jamieson CH, Ailles JE, Dylla SJ *et al.* (2004) Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast crisis CML. *N Engl J Med* **351**, 657-667.
45. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, *et al.* (1998) Embryonic stem cells lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147.
46. Ho AD, Wagner W y Mahlknecht U (2005) Stem cell and ageing. The potential of stem cells to overcome age-related deteriorations of the body in regenerative medicine. *EMBO reports* **6**, 35-S38.
47. Terada N, Hamazaki T, Oka M *et al.* (2002) Bonemarrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* **416**, 542-545.
48. Almeida-Porada G, Porada CD, Chamberlain J *et al.* (2004) Formation of human hepatocytes from human hematopoietic stem cells. *Blood* **104**, 2582-2590.
49. Zanjani ED, Ascensao, JH, Harrison MR y Tavasoli M (1992) Engraftment and longterm expression of human fetal hemopoietic stem cells in sheep following transplantation in utero. *J Clin Invest* **89**, 1178-1188.
50. Chen J (2004) Senescence and functional failure in hematopoietic stem cells. *Exp Hematol* **32**, 1025-1032.
51. Bach FH, Albertini RJ, Joo P *et al.* (1968) Bone-marrow transplantation in a patient with the Wiskott-Aldrich syndrome. *Lancet* **2**: 1364-1366 .
52. Thomas ED, Flournoy N, Buckner CD *et al.* (1977) Cure of leukemia by marrow transplantation. *Leukemia Res* **1**, 67-70.
53. De Pablo Dávila F (2009) Células madre neurales, precursores y neuroprotección. En: Células madre y terapia regenerativa (eds. F de Pablo Dávila y M. Cascales Angosto). Real Academia Nacional de Farmacia/Instituto de España. Madrid, pp. 101.
54. Muñoz JR, Stoutenger BR, Robinson AP *et al.* (2005) Human stem/progenitor cells from bonemarrow promote neurogenesis of endogenous neural stem cells in the hippocampus of mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 18171-18176.
55. Conboy IM, y Rando TA (2005) Aging stem cells: changes in proliferation potential as a function of age. *Cell Cycle* **4**, 407-410.
56. Soria Escoms B (2009) Terapia celular en la diabetes mellitus. En: Células madre y terapia regenerativa (eds. F de Pablo Dávila y M. Cascales Angosto). Real Academia Nacional de Farmacia/Instituto de España. Madrid, pp. 277-300.