



Revista Latinoamericana de Bioética

ISSN: 1657-4702

revista.bioetica@unimilitar.edu.co

Universidad Militar Nueva Granada

Colombia

Munévar Niño, Juan Carlos
OBTENCIÓN IN VITRO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS STEM DEL CORDÓN UMBILICAL
HUMANO COMO ALTERNATIVA DE LAS CÉLULAS STEM DE ORIGEN EMBRIONARIO PARA LA
MEDICINA REGENERATIVA

Revista Latinoamericana de Bioética, núm. 9, 2005, pp. 1-26

Universidad Militar Nueva Granada

Bogotá, Colombia

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=127020924003>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

OBTENCIÓN *IN VITRO* Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS STEM DEL CORDÓN UMBILICAL HUMANO COMO ALTERNATIVA DE LAS CÉLULAS STEM DE ORIGEN EMBRIONARIO PARA LA MEDICINA REGENERATIVA.

Munévar Niño Juan Carlos. Odontólogo, MSc Biología Osea, D.E.A. Especialista en Bioética. Profesor Asistente, Instituto U.I.B.O. Universidad El Bosque. 2005. e mail: munevarjuan@unbosque.edu.co

Resumen.

Durante siglos el hombre ha tratado de comprender la capacidad del cuerpo para reparar y reemplazar las células y tejidos del organismo. Después de años de trabajo dilucidando el como y el por qué de los mecanismos de reparación y regeneración tisular, los científicos se han enfocado en las células Stem. La identificación y aislamiento de células Stem de numerosos tejidos embrionarios y posnatales provee objetivos apropiados para una variedad de prácticas biotecnológicas denominadas generalmente como Medicina Regenerativa e Ingeniería Tisular. Desde el descubrimiento sobre la capacidad de las células Stem adultas para formar diferentes tipos de tejidos *in vivo* e *in vitro*, como una fuente alternativa para las células Stem embrionarias, lo que ofrece amplios potenciales terapéuticos para los seres humanos. La obtención de éstas células a partir del cordón umbilical humano es un sustituto interesante porque es un órgano fetal, fácil de obtener, descartable, lo que disminuye las dificultades bioéticas. En la Universidad El Bosque estamos aislando y caracterizando *in vitro* células Stem mesenquimatosas de la gelatina de Wharton del cordón umbilical de neonatos, obtenido previo consentimiento informado. Este sistema permitió obtener células precursoras viables de rápida proliferación que expresaron patrones de marcaje FGFR 3 (+), abriendo la puerta para poder diferenciarlas *in vitro* con fines terapéuticos.

Abstract.

For centuries, the man have been seeking to understand the body's ability to repair and replace the cells and tissues of the organism. After years of work pursuing the how and why of tissue repair and regeneration mechanisms, scientists have focused their attention on Stem cells. The identification and isolation of Stem cells from a number of embryonic and posnatal tissues provides appropriate targets for varied biotechnological practices referred to generally as Regenerative Medicine and Tissue Engineering. Since the discovery that adult stem cells have the capacity to form many different tissue types *in vivo* and *in vitro* and can be an alternative source for embryo Stem cells offering wide therapeutic potentials for human beings. The human umbilical cord as a source of Stem cells, can be an interesting substitute because it is a fetal organ, easy to obtain, discarded, diminishing bioethics dilemma. At the Universidad El Bosque we are isolating and characterizing *in vitro* Mesenchymal Stem cells from the Wharton's jelly of the umbilical cord of new born subjects, previous informed consent. This system permits to obtain viable precursor cells, of rapid proliferation that revealed FGFR 3 (+) marker patterns, opening the door for *in vitro* differentiation for therapeutic purposes.

INTRODUCCION.

Durante siglos, el hombre ha estado investigando la capacidad del cuerpo para reparar y reemplazar las células y tejidos de

algunos órganos desde diferentes disciplinas del conocimiento con metodologías a veces científicas. En efecto, desde la antigüedad, el hombre ha tratado

de identificar e incluso emplear sustancias que le permitan curar y prevenir sus dolencias. En un principio se emplearon productos naturales y se llegó al aislamiento de sustancias activas. Posteriormente se logró alcanzar la síntesis artificial de muchas de ellas e incluso se generaron compuestos mejorados con respecto a su actividad terapéutica. En la actualidad estos métodos tradicionales para el descubrimiento de medicamentos han sido complementados por una aproximación o enfoque más directo, lograda por el actual nivel de comprensión de las bases moleculares e interacciones que están detrás de la enfermedad. Estos avances fueron posibles luego de la aparición de nuevas áreas del conocimiento como la biología celular, la biología y la genética moleculares, más recientemente la bioquímica y la biofísica estructurales, la biología molecular computacional y la bioinformática.

Los enfoques terapéuticos recientes permiten recorrer el camino desde el gen que codifica para cierta proteína, resolver la estructura tridimensional de esta molécula identificada en alguna patología. Luego, con este conocimiento es posible diseñar y sintetizar una sustancia química que pueda interactuar con la molécula blanco para modular su actividad biológica en el sentido deseado.

Existen otras formas de establecer enfoques terapéuticos de pertinencia exclusiva del diseño moderno de medicamentos, como son: la química combinatoria y toda una serie de técnicas asistidas por computador. Los principales objetivos de la terapéutica clínica actual para el reemplazo y reconstrucción de tejidos se centraron en aliviar el dolor y restaurar la estabilidad mecánica, así como la función. En el transcurso de este siglo, la revolución médica se encargará de aumentar el promedio de vida de las personas, pues la ingeniería genética posee el potencial de conquistar el cáncer, la farmacogenómica permitirá bloquear el desarrollo de vasos sanguíneos en los tumores, la ingeniería de tejidos podrá desarrollar nuevos órganos biosintetizados *in vitro* a partir de células troncales o células madre (Stem cells) obtenidas del mismo paciente, con la posibilidad de ser previamente congeladas en un Banco de Células altamente especializado. Incluso se podría reprogramar la codificación genética

primordial que causa el envejecimiento celular. (1, 2, 3)

En la práctica clínica médica esencialmente se han tratado las consecuencias de las patologías. Sin embargo, estamos asistiendo al diseño y desarrollo de estrategias terapéuticas biológicas que podrían cambiar la esencia de los tratamientos médicos. Dentro de las aplicaciones terapéuticas recientes para las células Stem podemos mencionar: las leucemias agudas, las leucemias crónicas, los síndromes mielo-displásicos, los desordenes de células madre, los desordenes linfoproliferativos, las enfermedades de almacenamiento liposomal, los desordenes histolíticos, las anomalías hereditarias de los eritrocitos, los desordenes congénitos o hereditarios del sistema inmune, las anomalías hereditarias de las plaquetas, los desordenes de células plasmáticas, enfermedades auto inmunes y procesos neoplásicos como el sarcoma de Ewing, el neuroblastoma, el cáncer de ovario, el carcinoma de células renales y el cáncer pulmonar de células pequeñas entre otros. Las futuras estrategias terapéuticas hacia donde se enfoca la investigación con células Stem incluyen; infarto del miocardio, la diabetes, la distrofia muscular, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, patologías de la médula espinal, el Lupus eritematoso sistémico y la enfermedad de Lou Gehrig. (4).

Hace tan solo unos años, se pensaba que los tejidos humanos sólo podrían reemplazarse por transplantes procedentes de donantes o por dispositivos artificiales. Era difícil vislumbrar que se diseñarían órganos sintetizados en el laboratorio, para el alivio del sufrimiento causado por el daño irreversible de los tejidos (3). Se desarrolló entonces la ingeniería de tejidos como alternativa para generar novedosas estrategias terapéuticas con distintas aplicaciones en la práctica médica y odontológica, mediante el diseño *in vitro* de sustitutos o análogos de órganos y tejidos denominados "biomiméticos", para reemplazar órganos lesionados irreversiblemente sin importar el origen del agente lesionante. Esta disciplina también se encarga de utilizar principios bioactivos que biomimeten los procesos biológicos alterados que se efectúan normalmente

durante la organogénesis, para así propiciar la regeneración de los tejidos lesionados. (Figura 1) Del mismo modo, se generó la Terapia Tisular con el propósito de utilizar células aisladas *in vitro* para reemplazar aquellas presentes localmente en los tejidos enfermos o lesionados. (1, 3, 13, 15).

En Odontología, las aplicaciones terapéuticas de las células Stem primordiales generan la posibilidad de nuevos tratamientos que presentan ventajas sobre los enfoques terapéuticos actuales (5, 6). De este modo, la caracterización *in situ* de Células Stem o Células Madre Primordiales en el complejo pulpodental ofrece interesantes perspectivas para la práctica clínica y en ciencias básicas odontológicas (6). En el 2002, Young y colaboradores demostraron por primera vez la generación de coronas dentales constituidas por esmalte y dentina a partir de tejidos dentales disociados, sugiriendo la presencia de células stem en el mesenquima dental (5, 7, 8) Posteriormente, un grupo de investigación de los Institutos Nacionales de Salud (N.I.H) en Estados Unidos, dirigido por el científico Songtao Shi, publicó en la revista *The Lancet* en el 2004, la presencia, aislamiento y caracterización de células stem postnatales multipotenciales en el ligamento periodontal humano que podrán emplearse para regenerar los tejidos periodontales alterados (9). Este descubrimiento conservará intacto ese tejido conectivo altamente especializado en cuyo interior encontramos múltiples poblaciones celulares, moléculas y factores solubles e insolubles de la matriz extracelular, encargado de preservar la homeostásis de los tejidos dentales y periodontales.

Recientemente el profesor Paul T. Sharpe, en Londres, fundó en el año 2002, la compañía "*Odontis*", que permitirá diseñar *in vitro* órganos dentales a partir del aislamiento y caracterización bioquímica e inmunológica de células stem propias del paciente. Estos órganos dentales biosintéticos al ser implantados *in situ* en los mismos pacientes como trasplantes autólogos, permitirán el desarrollo y erupción de dientes biocompatibles con el mismo volumen, forma y propiedades ópticas que los originales perdidos. Es así como en la práctica clínica se abre la

puerta para estudios en Bioingeniería y Regeneración Tisular, incluso aparecen disciplinas clínicas como la Medicina Regenerativa.

Dentro de las principales líneas de investigación en Ingeniería Tisular y Medicina Regenerativa está el interés que despierta las células Stem o células Troncales, denominadas a veces "Células Madre". La célula Stem o célula madre, aunque difícil de definir por su complejidad, podemos decir que es una célula progenitora, con capacidad de auto renovación ilimitada, capaz de generar uno o más tipos celulares diferenciados (2, 4, 12, 13). Sin embargo, sólo las células Stem de ratón embrionarias obtenidas *in vitro* cumplen estos requisitos. En este artículo se mostrará con evidencia por qué las células Stem de la sangre y de la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano podrían reemplazar en el futuro las células Stem embrionarias para aplicaciones en terapia tisular y medicina regenerativa, evitando los distintos conflictos bioéticos, religiosos, de legislación y prácticos que despiertan las células Stem embrionarias humanas.

En los animales superiores, las células madre se han clasificado en dos grupos. Por un lado, las **células madre embrionarias** (Embryonic Stem Cells o ECS's), originadas de la masa celular interna del embrión en estadio de blastocisto (7-14 días), estructura a partir de la cual se originarán las tres capas que darán origen a todos los tejidos del cuerpo humano: ectodermo, mesodermo y endodermo. Estas células son capaces de generar los diferentes tipos celulares del cuerpo, por ello se llaman células pluripotenciales, pues conservan el potencial de formar tejidos diferenciados lo que serviría para aplicaciones terapéuticas en múltiples enfermedades. De estas células se derivarán, tras múltiples divisiones celulares, las células madre órgano-específicas. Estas células multipotenciales, son capaces de originar las células de un órgano en el embrión y en el individuo adulto.

Las células madre embrionarias murinas y humanas tienen un comportamiento similar; ambos tipos celulares requieren *in vitro* una capa subyacente de fibroblastos

embrionarios (feeder layer) para permanecer indiferenciadas; sin embargo las células Stem embrionarias **humanas** requieren adicionalmente la presencia de Factor de Crecimiento Fibroblástico Básico (bFGF) o Factor Inhibidor de Leucemia (LIF) (2, 4). Vale la pena destacar, la reciente publicación en la literatura científica de cultivos de células Stem sin la presencia de feeder layer, puesto que estas capas de fibroblastos murinos pueden causar la transferencia de moléculas responsables de rechazo a las células Stem humanas. Así mismo, la presencia de factores de transcripción y proteínas específicas, dirigen la nueva célula, tejido u órgano que debe formarse; por ejemplo la proteína Nanog promueve la auto - renovación y la pluripotencialidad de las células embrionarias, evento que no ocurre con las células Stem hematopoyéticas HSC; probablemente uno de los factores de transcripción más importantes en este tipo celular es el Oct-4 que regula la expresión de otras proteínas como Rex-1. Al estimular estas células con ácido retinóico, los niveles del factor Oct-4 disminuyen observándose la diferenciación de la célula Stem, razón que permite pensar la importante relación de esta molécula con el proceso de pluripotencialidad (14). Así mismo, se ha analizado la expresión genética de las células Stem embrionarias mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se ha obtenido proliferación en condiciones específicas de cultivo celular para determinar la capacidad de formar una amplia variedad de tejidos diferenciados. Ambos tipos de células Stem embrionarias tienden a formar *in vitro* acúmulos celulares descritos como cuerpos embrioides que se asemejan al blastocisto y adquieren características de endodermo, mesodermo y ectodermo (15, 16). Está reportada en la literatura científica, la capacidad de las células Stem embrionarias humanas para diferenciarlas en miocitos contráctiles, células semejantes a neuronas y células hematopoyéticas (4, 13, 15, 16).

El uso terapéutico de las células madre embrionarias humanas para reemplazar los tejidos y órganos afectados o lesionados irreversiblemente, es un objetivo excitante aunque bastante controvertido. Una fuente opcional para este tipo de tratamientos, es el uso de células madre específicas de tejido con un potencial más limitado y

comprometido de diferenciación, por ejemplo, las células madre hematopoyéticas que dan origen a todas las líneas celulares sanguíneas, con capacidad genéticamente restringida de diferenciarse a otros tipos celulares. Como las células Stem específicas de tejidos provienen de múltiples fuentes, cada una con potencial único propio, podría utilizarse esta capacidad combinada para cubrir un amplio espectro de terapias tisulares, lo que eliminaría la necesidad de emplear las células Stem embrionarias en un futuro.

Entre las **células madre específicas de tejido** mejor estudiadas encontramos las células Stem hematopoyéticas, capaces de generar todos los tipos celulares de la sangre y del sistema inmune en el transcurso de la vida del individuo, pero con capacidad limitada para diferenciarse en otras líneas celulares (13, 16, 17, 18, 19). Estas poblaciones de células Stem existen en muchos tejidos adultos del cuerpo humano, como ya se han aislado células Stem en la sangre del cordón umbilical como sustitutos de células hematopoyéticas de médula ósea, células Stem de tejido nervioso para auto - renovar sólo células nerviosas, células Stem de la piel, grasa subcutánea, células Stem de músculo cardíaco, células Stem de músculo esquelético (Side Population cells o células satélite), células Stem de retina, células Stem de páncreas, células Stem hepáticas (células ovales). (4, 13)

Teniendo en cuenta el enorme potencial para la aplicación clínica de las células Stem procedentes de embriones humanos, se han despertado grandes controversias a nivel mundial en el ámbito ético, religioso y político. Por esa razón se han buscado nuevas fuentes de células Stem, como en la sangre de cordón umbilical donde se han aislado y caracterizado células Stem hematopoyéticas (13, 16 18); así mismo en la Universidad El Bosque estamos identificado células Stem mesenquimatosas en la gelatina de Wharton del cordón umbilical humano (20).

Las células madre hematopoyéticas (HSC) son preprogramadas durante el desarrollo embrionario, pero el medio ambiente y la programación genética interna influyen igualmente. Las células multipotenciales de la línea primordial de embriones murinos permiten reproducir la formación de tejidos

específicos. Sin embargo, si células más comprometidas en una vía de diferenciación dentro un linaje primordial más avanzado son transplantadas, modificarán su fenotipo en otros tipos celulares similares al sitio huésped, dependiendo del sitio específico del trasplante. Sin embargo es probable la existencia de alguna predeterminación, debido a la capacidad de respuesta a las señales del medio circundante retenidas durante el paso a través de la línea primordial.

Diferenciación de las células madre específicas de tejido.

A primera vista, parece sorprendente la multipotencialidad característica de las células Stem específicas de tejido. La restricción de linaje celular puede ser un mecanismo muy importante que evolucionó en el transcurso del tiempo para aumentar la probabilidad de reproducir el desarrollo del embrión y asegurar que ocurra una restricción del desarrollo como respuesta a señales celulares externas, más que por limitaciones inherentes al potencial de las células madre específicas de tejido. Entonces podríamos plantearnos el interrogante: ¿Podrán modificarse estas células Stem específicas de tejido para producir células multipotentes similares a las células Stem embrionarias? Estudios *in vivo* describen la obtención de clones de poblaciones celulares multipotenciales, o únicamente células similares a las Stem embrionarias sugiriendo una respuesta afirmativa. De todos modos, son necesarias más investigaciones, que permitan verificar si las células Stem específicas de tejido podrían reemplazar el tejido lesionado o enfermo, por células funcionales.

Para poder utilizar estas células como terapia tisular de manera segura, primero se debe determinar el (los) mecanismo(s) de diferenciación de las células Stem. ¿Son capaces las células madre de responder a las distintas señales involucradas en un proceso de reparación y/o regeneración tisular? Se han realizado trasplantes de células madre hematopoyéticas (*HSC: Hematopoietic Stem cells*) en ratones irradiados severamente inmunosuprimidos induciendo daño tisular en la médula ósea, hígado, y otros tejidos. En estos casos se ha observado que diversos estímulos localizados en los tejidos afectados pueden

desencadenar mediante mecanismos de transducción de señales, la reparación tisular, así como un mecanismo de diferenciación similar al fenotipo del tejido lesionado. Recientemente se utilizaron células madre hematopoyéticas para tratar un modelo de la enfermedad de Parkinson en ratones, donde se demostró la presencia de células Stem hematopoyéticas (HSC) en la sustancia nigra, luego de ser transplantadas en las neuronas productoras de dopamina (21).

Un mecanismo alterno podría ser la fusión celular más que la transdiferenciación, en donde las células Stem no se transforman sino que se fusionan con otras adquiriendo las características particulares de éstas últimas. Recientemente se han cultivado células madre neuronales junto con una línea celular muscular (C2C12), lo que dio como resultado la conversión de las células neuronales en musculares; sólo si las células Stem neuronales establecían contacto con las células C2C12. Vale la pena destacar que esta conversión es irreversible; es decir una vez las células Stem se diferencian en músculo, pierden la capacidad de volver a ser células Stem neuronales (22). A pesar de no saber si las células Stem se fusionan o se transdiferencian, el resultado final es la reparación del tejido lesionado.

Evidencia Clínica de la Multipotencialidad de la Células Stem hematopoyéticas.

En un interesante estudio clínico, células de la médula ósea donadas se diferenciaron en hepatocitos funcionales en el hígado de un individuo receptor luego de un trasplante. Se trató de un estudio retrospectivo en el cual las células de la médula ósea transplantadas eran de un donante de diferente sexo al receptor. Usando una combinación de hibridación *in situ* y de fluorescencia específica de cromosomas sexuales (FISH), combinada con técnicas de inmunohistoquímica para marcadores específicos de hepatocitos, fue posible mostrar claramente que las células de la médula ósea contribuyeron en la formación de células hepáticas funcionales en los individuos receptores (23). Sin embargo estos pacientes fueron sometidos a dosis altas de radiación causando depleción total de las células de la médula ósea;

probablemente esa radiación ocasionó algún daño hepático al momento de realizar el trasplante de médula ósea. Esto pudo desencadenar una señalización apropiada inducida por el tejido lesionado produciendo la transdiferenciación de las células de la médula ósea en hepatocitos. Debe mencionarse la posibilidad de formación de los hepatocitos por mecanismos de fusión celular. Por lo tanto se deben realizar más estudios usando marcadores específicos para las células del receptor y el donante para determinar cuál es el mecanismo que se activa.

Clonación Terapéutica.

El nacimiento de Dolly en 1997 sugiere que el núcleo de una célula somática adulta diferenciada, reprogramada mediante transferencia nuclear somática (SNT), puede inducir la transdiferenciación de una célula Stem específica de tejido (25, 26). Recientemente Hochedlinger y Jaenisch usaron el núcleo de una célula B en un experimento de SNT para generar células Stem embrionarias funcionales (24). Estos estudios demuestran que las células adultas diferenciadas pueden ser reprogramadas para producir múltiples tipos celulares. La clonación terapéutica es algo atractiva ya que evita el problema de rechazo de tejidos por marcadores específicos de HLA. Sin embargo, embriones obtenidos por clonación pueden no ser normales en diferentes aspectos, incluyendo inestabilidad epigenética, función telomerasa alterada y no alcanzan el estadio de blastocisto para permitir la formación de las células Stem embrionarias desde la masa celular interna (26). Otro aspecto a considerar es la necesidad de oocitos humanos para realizar la SNT. Por el momento estos problemas hacen impracticable, si no inalcanzable la clonación terapéutica.

Células Stem Adultas derivadas de la Médula Ósea.

Las células estromales y las células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea son capaces de diferenciarse en múltiples tipos celulares, lo que demuestra propiedades similares a las células Stem embrionarias. Las HSC purificadas de la médula ósea y transplantadas en ratones pueden diferenciarse en hepatocitos y

recuperar una lesión hepática, lo cual demuestra funcionalidad (23). En otro estudio las HSC fueron purificadas y se examinaron las poblaciones clonales para determinar si experimentaban auto renovación o diferenciación. Al observarse la repoblación celular a largo plazo de hospederos irradiados se demuestra que estas células no sólo migran a la médula ósea, sino que también se pueden diferenciar en células epiteliales del hígado, pulmón, tracto gastrointestinal y piel, aunque en poca cantidad. Las células progenitoras mesenquimatosas derivadas del estroma de la médula ósea también tienen la capacidad de producir diversos tipos celulares, a partir de una población clonal, tanto *in vivo* como *in vitro*.

¿Son las Células Stem Hematopoyéticas de la Sangre de Cordón Umbilical Multipotentes?

La sangre de cordón umbilical fue usada exitosamente como sustituto de trasplante de médula ósea en un paciente con anemia de Fanconi en 1988 (18). Las células Stem hematopoyéticas se encuentran en la circulación fetal, en 100 ml de sangre de cordón umbilical y de la placenta; tejidos que siempre se descartan después del parto. En las siguientes horas después del parto, las células Stem hematopoyéticas migran a la médula ósea en donde proveerán los progenitores de todos los elementos figurados de la sangre, incluyendo eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

Por estas razones ha sido fundamental demostrar que las células Stem de la sangre de cordón umbilical poseen las mismas propiedades que las células Stem embrionarias. En efecto, en experimentos preliminares con células CD34+ de sangre de cordón umbilical humano, se demostró crecimiento *in vitro*, de células con morfología similar a mesenquima, y mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se observó que las células Stem expresaron positividad para el anticuerpo vimentina, confirmando una morfología mesenquimatosas. La diferenciación de estas células Stem, se comprobó al demostrar la expresión de marcadores de hueso (TRAP), músculo (desmina), neuronas (nestina), y astrocitos (Gfap). Estos resultados demuestran el

múltiple potencial de las células de la sangre del cordón umbilical, además que confirmo hallazgos previos.

Expansión de las Células Stem de Sangre de Cordón Umbilical.

En la sangre de cordón umbilical hay suficientes células Stem hematopoyéticas presentes para remplazar la médula ósea de un niño; solo el 25% de las muestras criopreservadas en un banco de células Stem, contienen un número suficiente de células para transplantar a un adulto. La expansión *in vitro* de las células Stem por lo tanto es la meta, no sólo para incrementar el uso de las HSC del cordón umbilical como reemplazo del trasplante de médula ósea, sino también para la terapia tisular. La obtención de un número suficiente de células Stem para hacer posible la terapia tisular, será un gran obstáculo a superar en un futuro no muy lejano. Las HSC pueden dividirse y dar origen a una célula hija Stem, y una célula progenitora, la cual puede producir células sanguíneas maduras. Reproducir este proceso de división *in vitro* sólo debe ser suficiente para mantener los niveles de la población inicial; además es difícil que las HSC proliferen dado que este proceso causa diferenciación al estimularlas con factores de crecimiento que modulan tanto la proliferación como la diferenciación. La barrera clave para lograr la expansión *in vitro*, es la pérdida de la autorenovación que ocurre durante la inducción de la proliferación celular. Para que una célula Stem dé origen a dos nuevas células Stem, las vías de diferenciación celular deben ser bloqueadas desencadenando proliferación, antes que inicie la programación interna de diferenciación celular (13, 27, 28).

Eficiencia de Diferenciación en Varios Tipos de Células Stem hacia Células Diferenciadas.

Aunque el porcentaje de HSC de sangre de cordón umbilical que demuestra marcadores no sanguíneos es bajo, otros tipos de células Stem presentan una baja tasa de diferenciación hacia células maduras. Las células Stem embrionarias murinas tiene una alta eficiencia de producción de células maduras específicas entre todas las células Stem.

Dang y col. incrementaron la producción de cuerpos embrioides al 42% con una diferenciación continua a HSC de cerca del 5%, incluso la conversión a marcadores neurales fue del 0.2%. También demostraron que cerca del 1% de las células aisladas en el día 9.5 producían esferas neurales, con un 20% de esferas primarias que eran capaces de producir esferas secundarias, de estas el 80% fueron positivas para oligodendrocitos, neuronas, y astrocitos, sin embargo la tasa de diferenciación fue de menos del 16% de la población de esferas primarias.

Cerca del 5% de las células aisladas de una biopsia de piel proliferan en cultivo y demuestran la capacidad de formar células neurales. Con células mesenquimatosas de la médula ósea, cerca de 1/10.000 de las células mononucleares adherentes (CD45-) producen una colonia proliferativa con múltiples potenciales. De estos aislamientos, al colocarse en distintos cultivos, el 90% empiezan o ser endotelio o neuronas, el 60% son albúmina positivas en cultivos, lo que favorece el desarrollo de hepatocitos. Algunos estudios recientes demuestran que cerca del 10% de una población enriquecida de células Stem de sangre de cordón umbilical pueden proliferar en cultivo y demostrar un rango de diferenciación. De las células que proliferan, el 80% pueden ser positivas para marcadores *in vitro* neurales, endoteliales, musculares o mesenquimatosos.

Las células Stem aisladas de diferentes fuentes, demuestran tasas similares de diferenciación. Lo que distingue una célula de otra, como candidato a terapia celular, es su capacidad de proliferar superando las bajas tasas de diferenciación. Actualmente las células Stem embrionarias poseen la más eficiente proliferación *in vitro*, pero en el futuro se buscará lograr condiciones que permitan obtener niveles altos de proliferación de células madre específicas de tejido.

¿Son las Células Stem de la Gelatina de Wharton de Cordón Umbilical Multipotentes?

La obtención de células Stem a partir del cordón umbilical humano es una alternativa interesante porque éste es un órgano fetal,

fácil de obtener, descartable, lo que disminuye las dificultades bioéticas. El cordón umbilical humano es el órgano encargado de la circulación feto placentaria y nutrición del embrión. En su interior se localiza un tejido conectivo mucoide embrionario denominado la gelatina de Wharton rodeando los elementos vasculares que lo conforman. En estudios previos se utilizó el cordón umbilical humano como revestimiento biológico en pacientes quemados (Banerjee y col. 1987) donde se utilizó como apósito en cirugías experimentales en perros acelerando la cicatrización, estimulando la regeneración tisular y favoreciendo el control de infecciones (29). Por esas razones, en el Instituto Unidad de Investigaciones Básica Oral de la Universidad El Bosque estamos efectuando investigaciones para determinar la presencia de células Stem multipotenciales en la Gelatina de Wharton del cordón umbilical humano (20), además de la presencia ampliamente descrita de células Stem en la sangre del cordón umbilical.

Se han identificado diferentes marcadores que permiten la caracterización *in vitro* de células Stem como la molécula CD 34, expresada por células Stem y células progenitoras hematopoyéticas (31); la expresión de la molécula SB 10, miembro de la familia de moléculas de adhesión leucocitaria ALCAM (32), la síntesis de pro colágeno IIa por células precursoras de condrocitos (33) y por último la presencia del receptor 3 del Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGFR 3) como marcador de células mesenquimatosas precursoras esqueléticas (34, 35, 36, 37, 38). La familia de Factores de Crecimiento Fibroblástico (FGF) participa en la regulación de la producción de tejido mesenquimatoso (36). Los Factores de Crecimiento Fibroblástico ácido y básico (FGF-1 / FGF- 2) pertenecen a la familia de factores de crecimiento que desempeñan un papel activo durante el crecimiento, diferenciación y regeneración de una gran variedad de tejidos. Se han descrito al menos 4 receptores de alta afinidad y sus variantes sintetizados por splicing alternativo de RNA m. Los receptores de la familia de Factores de Crecimiento Fibroblástico son miembros de la familia de receptores tirosina cinasa, que desempeñan un papel crucial durante el crecimiento y desarrollo de los tejidos

cartilagosos (37, 38). La asociación del FGFR 3 con el mesenquima y la formación temprana del hueso y cartilago explica los aspectos característicos de enfermedades que involucran mutaciones en este gen. El gen del receptor 3 del FGF (FGFR 3) está sobreexpresado en la Acondroplasia, un síndrome que involucra anomalías en la fisiología de células Stem mesenquimatosas (34, 36). La proteína FGFR 3 se localiza en las células periféricas de las articulaciones, expresándose principalmente en células de la zona pericondral. Posiblemente esto indicaría que la expresión de FGFR 3 se observa en las células mesenquimatosas antes de diferenciarse (34, 35). Los condrocitos presentes en muestras de biopsias de cartilago articular humano no expresan FGFR 3. Sin embargo, en cultivo las células sufren un proceso de dediferenciación permitiendo de nuevo la expresión de FGFR 3 y no secretan la matriz extracelular cartilaginosa específica (33, 36). Robinson y col en 1999 demostraron que las células precursoras del pericondrio y otras células precartilagosas que expresan el receptor 3 del Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGFR 3) son buenas células para implantarlas en la corrección de defectos del cartilago articular (33, 34, 35).

La presencia del FGFR3 en las células aisladas del cordón umbilical no había sido descrita anteriormente, parámetro a resaltar en una artículo original.

Realizamos entonces nuestro estudio utilizando muestras de cordón umbilical de neonatos donantes, obtenidas previo consentimiento informado. En condiciones de esterilidad, se obtuvo la gelatina de Wharton y se probaron dos métodos para la obtención de las células: sembrando explantes de 3 mm³ o por disociación enzimática. (**Microfotografía 1.**) Se analizó la dinámica de proliferación celular en los cultivos, mediante la inmunodetección de Bromodeoxiuridina (BrdU) y además se evaluó por inmunocitoquímica la expresión del receptor 3 para Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGFR3, como marcador de células progenitoras conjuntivas)

(**Microfotografía 2**) El porcentaje de células que entraron en fase S en los cultivos primarios fue de 19.07% ± 5.45, y de 24.01% ± 12.11 y 26.02% ± 4.65 en los subcultivos uno y dos respectivamente (**Gráfica 1**) La inmunoreactividad para

FGFR3 se ubicó en la mayoría de células simultáneamente en núcleo y citoplasma ($73.90\% \pm 3.80$), en menor porcentaje solo el núcleo ($17.74\% \pm 3.52$) y escasamente solo en citoplasma ($0.22\% \pm 0.13$). La expresión del marcador FGFR3 en el núcleo aumenta en los subcultivos (**Gráfica 2**)

Este sistema permitió obtener células precursoras viables y abre la puerta para poder diferenciarlas *in vitro* con fines terapéuticos con potenciales aplicaciones en patologías que comprometen los tejidos cartilagosos (artritis degenerativas), o enfermedades que involucran ampliamente los huesos (osteosarcomas) (20).

Por esa razón continuamos nuestras investigaciones con la aplicación de distintos estímulos *in vitro* como factores solubles específicos a distintas concentraciones en varios períodos de tiempo a las células Stem precursoras mesenquimatosas aisladas de la Gelatina de Wharton del cordón umbilical humano. Si estas células Stem precursoras mesenquimatosas llegan a estar dotadas de propiedades y características primordiales, serán una herramienta indispensable para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a tratar diversas enfermedades en la práctica clínica, según las necesidades clínicas y las condiciones fisiológicas del paciente individual.

Consideraciones bioéticas.

La utilización de células Stem embrionarias como terapéutica celular y tisular está limitada en últimas por aspectos éticos, puesto que estas células provienen de embriones humanos. La necesidad de practicar una tipificación HLA a los tejidos derivados de células Stem embrionarias para efectuar trasplantes alogénicos, requerirá en un futuro la producción y almacenamiento en un banco de células altamente especializado, de varios miles de líneas de células Stem embrionarias para hacer viable la terapia tisular y la medicina regenerativa. Este requisito necesita cientos de miles de embriones, debido a que aislar células Stem embrionarias a partir de embriones humanos resulta hasta el momento un procedimiento ineficiente e impracticable por los enormes conflictos bioéticos que se generan. Por esta razón se cree que una fuente no embrionaria de

células Stem ayudará a superar los conflictos bioéticos asociados con la utilización de células Stem embrionarias. De los estudios realizados con células Stem adultas, los que llaman más la atención son aquellos con células Stem de cordón umbilical porque se obtienen de material que se descarta después del parto. De este modo, se puede concluir que el desarrollo de varios miles de muestras de sangre de cordón umbilical dirigido a resolver el problema de compatibilidad de HLA es más práctico ya que depende solo del número de partos en una región particular y del consentimiento de los padres para donar la sangre del cordón umbilical.

(Microfotografía 1.)



Figure 1. First cell subculture of hMSC. Munevar, J.C.

(Microfotografía 2.)

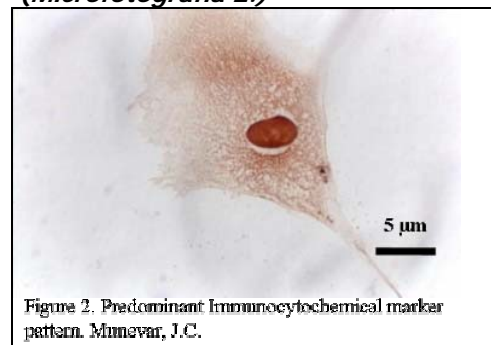


Figure 2. Predominant Immunocytochemical marker pattern. Munevar, J.C.

(Gráfica 1).

Cultivo celular	% BrdU
Primario	19.07 ± 5.45
Subcultivo 1	24.01 ± 12.11
Subcultivo 2	26.02 ± 4.65

Gráfica 2. Porcentaje de inmunoreactividad de las células de la gelatina de Wharton a la

Bromodeoxiuridina en diferentes pasajes y sus desviaciones estándar.

(Gráfica 2)

Cultivo celular	% núcleo
Primario	22.81 ± 4.37
Subcultivo 1	24.97 ± 3.74
Subcultivo 2	27.92 ± 3.0
Cultivo celular	% citoplasma
Primario	1.43 ± 0.33
Subcultivo 1	0.91 ± 0.25
Subcultivo 2	0.33 ± 0.14
Cultivo celular	% Núcleo / citoplasma
Primario	75.88 ± 4.63
Subcultivo 1	74.09 ± 3.96
Subcultivo 2	71.74 ± 2.93

Gráfica 2. Porcentaje de distribución de la expresión de FGFR3 en la gelatina de Wharton's del cordón umbilical humano en diferente pasajes y sus desviaciones estándar.

CONCLUSIONES.

De manera natural, los tejidos del cuerpo a lo largo de la vida sufren un deterioro, del que se defienden desarrollando la capacidad intrínseca de remodelar esos tejidos que se desgastan. De no existir esta regeneración, se reduciría considerablemente la esperanza de vida de los seres vivos. Por otro lado, diversas enfermedades que afectan al ser humano, se basan en la degeneración y muerte de los distintos tejidos que conforman nuestro cuerpo, ya sea de manera aguda (infartos) o crónica (degeneración-envejecimiento). El avance de la medicina ha desarrollado técnicas que consiguen reparar los tejidos a través de los trasplantes. Sin embargo, se abren ahora nuevas posibilidades: La nueva medicina regenerativa, que se propone regenerar desde el punto de vista estructural/funcional y no sólo reparar los tejidos dañados utilizando mecanismos similares a los que de forma natural usa el organismo para este fin, y que por razón de la rapidez del daño, no es capaz de hacer eficazmente. Entran entonces a jugar un papel muy importante las células Stem.

No cabe duda de que estos nuevos descubrimientos, marcarán una estrategia de impacto en el campo de los nuevos tratamientos en medicina. La medicina regenerativa, basada en el uso terapéutico

de las células Stem, sale al paso del aumento en la incidencia de enfermedades de tipo degenerativo asociadas irreversiblemente al incremento en la esperanza de vida mundial y al envejecimiento de la población. (1) (4) Además de los nuevos conocimientos en embriología, en biología del desarrollo, de las vías de señalización y de los mecanismos bioquímicos y biofísicos que desencadenan la formación de diversos tejidos para su potencial uso en la terapia tisular o celular en el área de la salud.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Robert L, William C., Cell and Molecular Engineering of Bone Regeneration. Principles of Tissue Engineering. Landes Company, 1997.
2. Thomson J A., Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Watnitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, y cols. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 1998; 282: 1145-7
3. Langer R. Tissue Engineering. Science.1993; 260(5110):920-932.
4. Edwards Bob. Stem cells today: A. origin and Potential of embryo stem cells. Reproductive BioMedicine on line. 2004; Vol. 8. 5. 275 - 306.
5. Gronthos. S, Mankani. M, Brahim.J, Geronh. R and Shi. S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro and in vivo*. 2000. Proc. Natl. Acad. Sci. 97; 25: 13625-13630.
6. Paul H. Krebsbach, 2002. Dental and skeletal stem cells: Potential cellular Therapeutic for craniofacial regeneration. J. of dental education. 66 (6): 766-773
7. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Gheon Robey P, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro and in vivo*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 5, 2000. 97. Vol 25: 13625 - 630.
8. Gronthos S. et al. 2002. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. J. Dent Res. 81 (8): 531-535.
9. Byoung M. S, Masako M., Gronthos S., Bartold P. M., Batouli S., Young M., Geron Robey P., Wang C., Shi S. The Lancet. Investigation of multipotent postnatal stem cells

from human periodontal ligament. 2004. Vol. 364, 149 - 155.

10. Goldberg M., Six N., Decup F., Bourd K., Palmier K., Salih E., Veis A., Lasfargues J. J. Minéralisation de la pulpe dentaire: apports de l'ingénierie tissulaire aux thérapeutiques de demain en odontologie. *Pathol Biol.* 2002; 50: 194 - 203.

11. SHI S. 2001. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone.* 29 (6): 532-539.

12. Fuchs E, Segre J. A. 2000. Stem cell: a new lease on life. *Cell* 100: 143-155.

13. Verfaillie, C.M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. 2002 *TRENDS in Cell Biology* 12; 11: 502-508.

14. Wilmut I, Schnieke A. E, McWhir J, Kind A. J, Campbell K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810 – 3.

15. Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz – Eldor J, Melton D. A, Benvenisty N. From the cover: effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1307 – 12.

16. Harder F, Henschler R, Jungham I, Lamers M. C, Muller A. M. Human hematopoiesis in murine embryos after injecting human cord blood derived hematopoietic stem cells. *Blood* 2002; 99: 719 – 21.

17. Laggase E, Connors H, Al-Dhalimy M, Reitsma M, Dohse M, Osborne L. Purified Hematopoietic Stem cells can differentiate into hepatocytes *in vivo*. *Nat Med.* 2000;6: 1229 – 34.

18. Gluckman E, Broxmeyer H. A, Auerbach A. D, Friedman H. S, Douglas G. W, Devergie A. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's Anemia by means of umbilical cord blood from an HLA identical sibling. *N Engl J Med.* 1988; 321: 1174 – 8.

19. Madlambayan G. J, Rogers I, Casper R. F, Zandstra P. W. Controlling culture dynamics for the

expansion of hematopoietic stem cells. *J Hematother Stem Cell Research.* 2001; 10:: 481 – 92.

20. Munévar J. C., Castellanos J. E., Martinez M, Acosta L. P., Hurtado H., Lafaurie G. Immunocytochemical characterization of Mesenchymal Stem cells from de human umbilical cord. *In vitro cell animal biology.* 2004. Submitted

21. Nagatsu T. Parkinson's disease: changes in apoptosis related factors suggesting possible gene therapy. *J Neural Trans.* 2002;109: 731 – 45.

22. Gali R, Borello U, Gritti A, Minasi M. G, Bjornson C, Coletta M. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci.* 2000; 3: 986 – 91.

23. Theise N. D, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei P.B, Morgan G, Teperman L. Liver from bone marrow in humans. *Hepatology* 2000; 32: 11 – 6.

24. Hochedlinger K, Jaenisch R. Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature* 2002; 415: 1035 – 8.

25. Betts D, Bordignon V, J, Hill J, Winger Q, Westhusin M, Smith L. Reprogramming of telomerase activity and rebuilding of telomerase length in cloned cattle. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 1077- 82

26. Mann M. R, Bartolomei M. S. Epigenetic reprogramming in the mammalian embryo: struggle of the clones. *Genome Biol.* 2002; 3.

27. Constantinescu S. Stemness, fusion and renewal of HSC and ESC. *J Cell Mol Med.* 2003 Apr-Jun;7(2):103-12

28. Stem cell research - second update. The Royal Society, Policy document 0/01, June 2001, London.

29. Ryyanen, ET, Tan, E, Hoffren J. Type VII Gene Expression In Human Umbilical Tissue And Cells. *Lab. Invest,* 69, (3):300-304, 1993.

30. Caplan, A. I: The mesengenic Process. *Clinics in Plastic surgery,* 21(3) : 429, 435. 1994.

31. Pittenger M, Mackay A, Beck S,. Multilineage potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science.* 1999. 284 2 April.

32. Bruder S, Lawrence E. G, Haynesworth S. E. The generation of monoclonal antibodies against human osteogenic cells reveals embryonic bone formation *in vivo* and differentiation of purified mesenchymal stem cells *in vitro*. *Trans Ortho Res Soc.* 1995. 20: 8
33. Oganessian A, Zhu Y, Sandell L. Type IIa procollagen amino propeptide is localized in human embryonic tissues. *Journal of Histochemistry and Histochemistry.* 1997. Vol 45, 1469 - 80.
34. Dror Robinson, Amir Hasharoni, Nir Cohen; Fibroblast Factor Receptor-3 as a Marker For Precartilaginous Stem Cells; *Clin Orthop.* 367: 163-175. 1999.
35. Dror Robinson, Amir Hasharoni, Nahum Halperin, Avner Yayon, Zvi Nevo. Mesenchymal cells and growth factors in bunions. *Foot and Ankle International.* 727 - 32. 1999.
36. Hasharoni A, Robinson D, Hecht D, Dekel S, Halperin N, Yayon A, Nevo Z. Fibroblast Growth Factor Receptor 3 as a marker of mesenchymal precartilaginous stem cells which disappears in mature chondrocytes. *Ortho. Bull,* 16: 53, 1996.
37. Abraham, K. B. ; Givol, D. ; Avivi, A. ; Yayon, A. ; copeland, N. G. ; Jenkins, N. A. : Mapping of murine fibroblast growth factor receptors refines regions of homology between mouse and human chromosomes. *Genomics* 21: 656-658, 1994.
38. Keegan, K.; Jonson, D.E.; Williams, L.T.; Hayman, MJ.: Isolation of an additional member of the fibroblast growth factor receptor family, FGFR-3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 1085-1099, 1991.
39. Gill P, Jarjoura D. Wharton's Jelly in the umbilical cord. A study of its quantitative variations and clinical correlates. *Journal of Reproductive Medicine.* Vol 38; 8. 611 - 14. 1993.
40. Franc S, Rousseau, JC; Gorrene R. Microfibrillar Composition of umbilical cord matrix: Characterization of fibrillin, collagen VI and intact collagen V. *Placenta,* 19(1):9104, 1998.
41. Ghezzi, L. Raio, E. Di Naro, M. Franchi, D. Balestreri and V. D'Addario; Nomogram of wharton's jelly as depicted in the sonographic cross section of the umbilical cord; *Ultrasound Obstet Gynecol,* 18: 121-125.2001. Goodman SR.: Medical Cell Biology, J.B. Lippincott Company Pennsylvania, 193-200, 1994.
42. Takechi, K, Kuwabara, Y, Mizuno, M.: Ultrastructural And Immunohistochemical Studies Of Wharton's Jelly Umbilical Cord Cells, *Placenta,* 14(2): 235-245, 1993.
43. Nanaev. A. K, Kohnen. G, Milovanov. A. P, Domogatsky y Kaufmann;1997, Stromal differentiation and architecture of the human umbilical cord; *Placenta* 18 .53-64.
44. Sobolewiski, K, Bankowski, E, Chyczewiski, I, Jaworsky, s: Collagen and Glicosaminoglicans of Wharton's jelly. *Biol-Neonate,* 18(1):11-21, 1997.

ANEXOS.

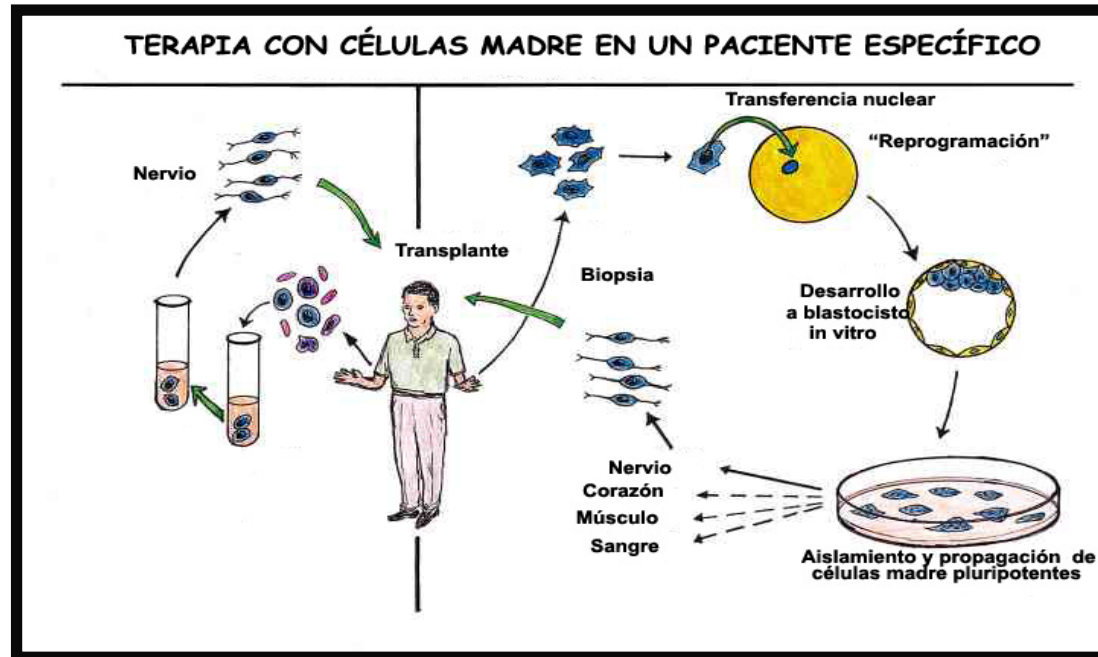


Figura 1. La identificación y aislamiento de células Stem de numerosos tejidos embrionarios y postnatales provee objetivos apropiados para una variedad de prácticas biotecnológicas denominadas generalmente como Medicina Regenerativa e Ingeniería Tisular.

***IN VITRO* OBTENTION AND CHARACTERIZATION OF STEM CELLS FROM THE HUMAN UMBILICAL CORD AS AN ALTERNATIVE OF EMBRYONIC STEM CELLS FOR REGENERATIVE MEDICINE.**

Munévar Niño Juan Carlos, Dentist, Msc. Bone Biology. D. E. A. Specialist in Bioethics. Assistant Professor, Institute U. I. B. O, El Bosque University. 2005. e-mail: munevarjuan@unbosque.edu.co

Abstract

For centuries man has been seeking to understand the body's ability to repair itself and to replace cells and tissues of the organisms. After years of pursuing the how and the why of tissue repair and regeneration mechanisms, scientists have focused their attention on Stem Cells. The identification and isolation of stem cells from a number of embryonic and postnatal tissues provides appropriate targets for varied biotechnological practices referred to generally as Regenerative Medicine and Tissue Engineering. Since the discovery that adult stem cells have the capacity to form many different tissue types *in vivo* and *in vitro*. And can be an alternative source for embryo stem cells offering wide therapeutic potentials for human beings. The human umbilical cord as a source of stem cells can be an interesting substitute because it is a fetal organ, easy to obtain, discarded, diminishing bioethics dilemmas. At El Bosque University we are isolating and characterizing *in vitro* Mesenchymal Stem cells from the Wharton's jelly of the umbilical cord of new born subjects, previous informal consent. This system permits to obtain viable precursor cells, of rapid proliferation that revealed FGFR 3 (+) marker patterns, opening up the door for *in vitro* differentiation for therapeutic purposes.

INTRODUCTION

For centuries man has been researching the body's capacity to repair and replace cells and tissues of some organs, from different disciplines of knowledge and with sometimes scientific disciplines. In effect, from antiquity, man has tried to identify and even use substances that allow him to cure and prevent his illnesses. At the beginning natural products were used, and the isolation of active substances was obtained. Later on the artificial synthesis of some of them was obtained, and improved composites in relation to the therapeutic activity were generated. Presently, these traditional

methods for the discovery of medications have been complemented by a more direct approximation or focusing reached at due to the present level of understanding of the molecular bases and the interactions taking place behind the disease. These advancements were possible after the appearance of new fields of knowledge such a cell biology, molecular biology and genetics, and more recently biochemistry and structural biophysics, computational molecular biology and bioinformation technology.

Recent therapeutical focuses allow to thread the path from the gene that codifies for certain protein the tridimensional structure of this molecule identified in some pathology. Then, with this knowledge it is possible to design and synthesize a chemical substance that can interact with the target molecule to modulate its biological activity in the sense desired.

There exist other ways to establish therapeutic focuses that belong exclusively to the modern design of medications such as: combinatory chemistry and a whole series of computer-assisted techniques. The main objectives of the present therapeutic clinic to replace and reconstruct tissues were centered on the alleviation of pain and the restoration of the mechanical activity and its function. Throughout this century the medical revolution will be in charge of increasing the people's life expectancy average, since genetic engineering has the potential to overcome cancer; pharmacogenomics will allow to block the development of blood vessels in tumors; tissue engineering will be able to develop new biosynthesized organs *in vitro* as of stem cells obtained from the same patient, with the possibility of their being previously frozen in a highly specialized Cell Bank. It will even be possible to program again the primordial genetic coding that causes cellular aging (1,2,3).

In practical medical clinic what has been treated is, in essence, the consequences of pathologies. Nevertheless, we are witnessing the design and development of biological strategic therapies that could change the essence of medical treatments. Among the recent therapeutic applications for stem cells we can mention: acute leukemia, chronic leukemia, myelo-displacic (?) syndromes; stem cells disorders; liposomal storage diseases; histolytic disorders; hereditary anomalies of erythrocytes; congenital or hereditary disorders of the immune system;. Hereditary anomalies of platelets, disorders of plasmatic cells; self-immune diseases and neoplasia processes such as Ewing's sarcoma, neuroblastoma, cancer of the ovary, carcinoma of renal cells, and lung cancer of small cells among others. The future therapeutical strategies towards which research is focused using stem cells include: infarct of the myocardium, diabetes, muscular

dystrophy, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, pathologies of the spinal chord, the systemic erythematous Lupus, and Lou Gehrig's disease. (4)

Until not many years ago, it was thought that human tissues could only be replaced by transplants from donors or by artificial devices. It was difficult to foresee the lab design of synthesized organs, to alleviate suffering caused by irreversible damage in the tissues (3). Tissue engineering was then developed as an alternative to generate novel strategic therapies with different applications in medical and dental practice through the *in vitro* design of substitutes or analog organs and tissues called "bio-mimetic," to replace irreversibly damaged organs regardless of the origin of the damaging agent. This discipline is also in charge of utilizing bioactive principles that biomimic (?) the altered biological processes that normally take place during organogenesis to, this way, provide the regeneration of the damaged tissues. Likewise Tissue Therapy was developed in order to use isolated cells *in vitro* to replace those present locally in the diseased or damaged tissues.

In dentistry the therapeutical applications of primordial stem cells generate the possibility of new treatments that provide advantages over present therapeutical focuses (5, 6). Thus, the characterization *in situ* of stem or primordial cells in the pulp-dentinal (?) complex offers interesting perspectives for clinical practice and in basic dental sciences (6). In 2002, Young and collaborators showed for the first time the generation of dental crowns conformed by enamel and dentine as of disassociated dental tissues, thus suggesting the presence of stem cells in the dental mesenchymal (?) (5, 7, 8). Later on, a research group from the U S National Institutes of Health (N.I.H.) under the direction of scientist Songtao Shi, published in *The Lancet* magazine in 2004, the presence, isolation and characterization of multipotent postnatal stem cells in the human periodontal ligament that could be used to regenerate altered periodontal tissues (9). This discovery will preserve intact that highly specialized connective tissue in whose interior we find multiple cellular, molecular and soluble and insoluble populations of the extra-celular matrix, in charge of preserving the homeostasis of the dental and periodontal tissues.

In 2002 professor Paul T. Sharpe founded in London the company *Odontis*, which will allow to design *in vitro* dental organs as of the isolation and biochemical and immunologic characterization of the patient's own cells. These biosynthetic dental organs, when implanted *in situ* in the same patients as autologous transplants, will

allow for the development and appearance of bio-compatible teeth with the same volume, shape and optical properties of the original lost ones. So it is that in clinical practice the door is open to carry out studies in Bioengineering and Tissular Regeneration; even clinic disciplines such as Regenerative Medicine make now their appearance.

Along the main lines of research in Tissular Engineering and Regenerative Medicine there lies the interest in stem cells. We can say that the stem cell, even though difficult to define because of its complexity, is a progenitor cell, with the capacity for limitless self-renewal, capable of generating one or more differentiated cell types (2, 4, 12, 13). However, only embryonic mouse stem cells obtained *in vitro* fulfill these requirements. In this article this will be shown with ample evidence since stem cells from the blood of Wharton's jelly from the human umbilical cord could replace in the future embryonic stem cells for application in tissular therapy and in regenerative therapy, thus avoiding the different bioethical, religious, legal and practical conflicts generated by human stem cells.

In higher animals, stem cells have been classified in two groups. On the one hand, **embryonic stem cells** (ECS's), originated in the embryo's internal cell mass at the blastocyst stage (7 – 14 days), structure as of which they will originate the three layers which will give origin to all the human body's tissues: ectoderm, mesoderm and endoderm. These cells are capable of generating the body's different cellular types; that is why they are called pluripotential cells, as they preserve the potential to form differentiated tissues, which would be useful for therapeutic applications in multiple diseases. From these cells will derive, after multiple cellular divisions, the organ-specific stem cells. These multipotential cells are capable of originating an organ both in the embryo and in the adult individual.

Murine and human embryo stem cells both have a similar behavior; both cell types require *in vitro* an underlying layer of embryonic fibroblasts (feeder layer) to remain undifferentiated, However, **human** embryonic stem cells require in addition the presence of the Basic Fibroblastic Growth Factor (bFGF) or Leukemia Inhibitor Factor (LIF) (2, 4). It is worthwhile to point out the recent publication in scientific literature regarding stem cell cultures without the presence of feeder layers, since these layers of murine fibroblasts can cause the transferal of molecules responsible for the rejection to human stem cells. Likewise, the presence of transcription factors and specific proteins lead the new cell, tissue or organ that ought to be formed; for example, the Nanog protein incentivates the self-renovation and the pluripotentiality of embryonic cells, event that does not happen

with hematopoietic stem cells (HSC). Probably one of the most important transcription factors in this cellular type is Oct-4, which regulates the expression of other proteins such as Rex-1. By stimulating these cells with retinal/retinoic (?) acid, the levels of factor Oct-4 diminish, a differentiation of the stem cell being observed. For this reason it can be thought of the important relation existing between this molecule and the pluripotentiality process (14). Likewise, the genetic expression of stem cells has been analyzed through the polymerase chain reaction, and proliferation has been obtained in specific conditions of cell cultures to determine the capacity to form a wide variety of differentiated tissues. Both types of embryonic stem cells tend to form *in vitro* cell cumuli described as embryo-like bodies that are similar to the blastocyst, and that acquire the characteristics of the endoderm, mesoderm and ectoderm (15, 16). The capacity of human embryo stem cells to differentiate in contractile myocyte/mitotic (?), cells similar to neurons and hematopoietic cells, is reported in scientific literature.

The therapeutical use of human embryonic stem cells to replace affected or irreversible damaged tissues and organs is an exciting objective although rather controverted. One optional source for this type of treatment is the use of specific stem cells from the tissue with a more limited and compromised differentiation potential. For example, hematopoietic stem cells that originate all the blood cell lines, with the genetically restricted capacity to differentiate from other cellular types; since specific stem cells come from multiple sources, each one with its own unique potential, this combined capacity could be used to cover a wide spectrum of tissular therapies, need to use embryonic stem cells in the future.

Among the best studied *specific tissue stem cells* we find hematopoietic stem cells, capable of generating all cell types of the blood and immune system throughout the individual's life, but with the limited capacity to differentiate themselves in other cellular lines (13, 16, 17, 18, 19). These stem cell populations exist in many adult tissues of the human body. The isolation of stem cells has already taken place in the blood of the umbilical cord as hematopoietic cells of the bone marrow; stem cells of the nervous tissue for the renovation of only nervous cells; skin stem cells; subcutaneous fat; stem cells of the cardiac muscle; stem cells of the skeletal muscle (side population or satellite cells); retina stem cells; pancreas stem cells; hepatic (oval) cells (4, 13).

Keeping in mind the enormous potential for the clinical application of stem cells from human embryos, great controversies have arisen world wide in the ethical, religious and political environs. Because of

this, new sources of stem cells have been looked for, such as in the blood of the umbilical cord where hematopoietic stem cells have been isolated and characterized (13, 16, 18); likewise, at El Bosque University we are presently identifying mesenchymal stem cells in Wharton's jelly in the human umbilical cord (20).

Human hematopoietic stem cells (HSC) are pre-programmed during the embryonic period, but the environment and the internal genetic programming, likewise, have an influence. Multipotent cells of the primordial line of murine embryos allow to reproduce the formation of specific tissues. Nevertheless, if cells that are more compromised in a line of differentiation within a more advanced primordial lineage are transplanted, they will modify their phenotype in other types of cells similar to the host site depending on the specific place of the transplant. Yet, the existence of some predetermination is probable due to the capacity of answering to the signals of the surrounding environment that are retained during the going through the primordial line.

Differentiation of stem cells from specific tissue

At first sight, the multipotent characteristic stem cells from specific tissue seems surprising. The restriction of cellular lineage can be a very important mechanism that evolved throughout time to increase the probability to reproduce the embryo's development, and to make sure that a developmental restriction take place as an answer to external signals, more than due to limitations inherent to the potential stem cells from specific tissue. Then we could ask ourselves the following question: Could these stem cells from specific tissue be modified in order to produce multipotent cells similar to embryonic stem cells? *In vitro* studies describe the obtention of clones of multipotent cell populations similar to embryonic stem cells, thus suggesting an affirmative answer. Anyway, more research is necessary that will allow to verify whether stem cells from specific tissue could replace the injured or damaged tissue for functional cells.

To be able to use these cells as tissular therapy in a safe way, the differentiation mechanism(s) of the stem cells must be determined first. Are the stem cells capable of responding to the different signals involved in the tissular repair and/or regeneration process? There have been transplants of hematopoietic stem cells (*HSC*) in irradiated mice severely immuno-suppressed inducing tissular damage in the bone marrow, liver and other tissues. In these cases it has been observed that diverse stimuli located in the affected tissues can unleash, through signal transduction mechanisms, tissular repair, as well as a differentiation mechanism similar to the phenotype of the

damaged tissue. Recently, hematopoietic stem cells were used to treat a model of Parkinson's disease in mice, through which the presence of hematopoietic stem cells was shown in the nigra (?) substance after they were transplanted in the neurons that produce dopamine. (21)

An alternate mechanism could be cellular fusion more than trans-differentiation, in which stem cells do not transform themselves; they fuse themselves with others acquiring the specific characteristics of the latter ones. Recently, neuronal stem cells have been cultured together with the muscular cell line (C2C12), which resulted in the conversion of neuronal cells in muscular ones only if the neuronal stem cells made contact with the C2C12 cells. It is worthwhile to note that this conversion is irreversible; that is, once the stem cells are differentiated, they lose their capacity to become again neuronal stem cells (22). In spite of the fact that it is not known whether the stem cells fuse themselves or they trans-differentiate themselves, the final outcome is the repair of the injured tissue.

Clinical Evidence of the Multipotentiality of Hematopoietic Stem Cells

In an interesting clinical study, stem cells from donated bone marrow cells differentiated themselves into functional hepatocytes in the liver of a receptor individual after a transplant. It was a retrospective study in which the transplanted cells of the bone marrow belonged to a donor of different sex from the receiver's. Using a combination of *in situ* hybridization and the specific fluorescence of sexual chromosomes (FISH), combined with immunohistochemical (?) techniques for specific hepatocyte markers, it was possible to show clearly that the bone marrow cells contributed in the formation of functional hepatic cells in the receptor individuals (23). However, these patients were subjected to high doses of radiation generating total depletion of the bone marrow stem cells; probably this radiation caused some hepatic damage when the bone marrow was being transplanted. This may have unleashed some appropriate signaling induced by the injured tissue producing the trans-differentiation of the bone marrow cells into hepatocytes. The possibility of formation of hepatocytes by mechanisms of cellular fusion must also be mentioned. Therefore, more studies using specific markers for the receptor individual's cells and the donor's must be carried out in order to determine which is the mechanism being activated.

Therapeutic Cloning

Dolly's birth in 1997 suggests that the nucleus of an adult differentiated somatic cell, re-programmed through nuclear somatic transference (NST) can induce the trans-differentiation of a stem cell from specific tissue (25, 26). Recently, Hochedlinger and Jaenich used the nucleus of a B cell in a NST experiment to generate functional embryo stem cells (24). These studies show that adult differentiated cells can be reprogrammed to produce multiple cell types. Therapeutic cloning is somewhat attractive since it avoids the problem of tissue rejection by specific HLA markers. However, embryos obtained through cloning may not be normal in different aspects, including epigenetic instability and altered telomere function, and they do not reach the blastocyst stage to allow for the formation of embryo stem cells as of the internal cell mass (26). Another aspect to consider is the need for human oocytes to carry out NST. Presently these problems make therapeutic cloning not only impractical but also out of reach.

Adult Stem Cells Derived from Bone Marrow

Stromal cells and hematopoietic cells derived from the bone marrow are capable of differentiating themselves in multiple cellular tissues, which shows properties similar to those of embryo stem cells. Purified HSCs from the bone marrow that are transplanted into mice can differentiate themselves in hepatocytes and cure a hepatic injury, which shows functionality (23). In another study, HSCs were purified, and clonal populations were examined to determine if they experimented self-renewal or differentiation. When observing cell re-population throughout irradiated hosts, it is shown that these cells not only migrate to the bone marrow, but they can also differentiate themselves into liver, lung, gastro-intestinal tract and skin epithelial cells, even though in small amounts. Progenitor mesenchymal cells derived from the stroma of the bone marrow also have the capacity to produce diverse cell types as of a clonal population, both *in vivo* and *in vitro*.

Are Hematopoietic Stem Cells from the Umbilical Cord Blood Multipotent?

Blood from the umbilical cord was used as a substitute for bone marrow transplant in a patient suffering from Fanconi's anemia in 1988 (18). Hematopoietic stem cells can be found in fetal blood circulation, in 100 ml of blood from the umbilical cord and placenta, tissues that are always discarded after delivery. In the hours following after birth, hematopoietic cells migrate to the bone marrow where they will supply progenitors with all the blood's regular elements, including erythrocytes, leukocytes, and platelets.

For these reasons it has been essential to show that blood stem cells from the umbilical cord possess the same properties of embryo stem cells. As a matter of fact, in preliminary experiments with CD34+ cells from the human umbilical cord *in situ*, growth of cells with similar morphology to mesenchym's was demonstrated; and through polymerase chain reaction (PCR), it was observed that stem cells expressed positiveness towards the vimentin antibody, thus confirming mesenchym morphology. The differentiation of these stem cells was proved when bone (TRAP), muscle (desmina) (?), neurons (nestina) (?), and astrocytes (Gfan) markers were expressed. These results show the multiple potential of the blood cells from the umbilical cord, plus the fact that it confirmed previous findings.

Expansion of Stem Cells from Umbilical Cord Blood

In the umbilical cord blood there are enough hematopoietic stem cells present to replace a child's bone marrow; only 25% of the cryo-preserved samples in a stem cell bank have a sufficient number of cells to be transplanted into an adult. *In vitro* expansion of stem cells is, therefore, the goal not only to increase the use of HSC from the umbilical cord as a replacement for bone marrow transplant, but also for tissular therapy. The obtention of a sufficient number of stem cells to make tissular therapy possible will be a great obstacle to overcome in the not very distant future. HSCs can divide themselves and give origin to a stem daughter cell and to a progenitor cell that can produce mature blood cells. To reproduce this *in vitro* division process must only be sufficient to preserve the initial population levels; besides, it is difficult that HSCs proliferate since this process causes differentiation by stimulating them with growth factors that modulate both proliferation and differentiation. The key barrier to achieve *in vitro* expansion is the loss of self-renewal which takes place during the induction of celular proliferation. For a stem cell to give origin to two new stem cells, the paths of celular differentiation must be blocked, thus unleashing proliferation before the internal cell differentiation programming starts. (13, 27, 28).

Efficiency of Differentiation in Various Types of Stem Cells towards Differentiated Cells

Even though the percentage of HSCs of umbilical cord blood that shows non sanguineous markers is low, other types of stem cells do show a low rate of differentiation towards mature cells. Murine embryonic stem cells have a higher production efficiency for the production of specific mature cells among all stem cells.

Dang and collaborators increased the production of embryoid bodies to 42% with a continued differentiation towards HSCs of around 5%; even the conversion to neural markers was 0.2%. They also showed that almost 1% of the isolated cells during day 9.5 produced neural spheres with a 20% of primary spheres that were capable of producing secondary spheres; from these, an 80% were positive for oligodendrocytes, neurons and astrocytes. However, the differentiation rate was less than 16% of the population of primary spheres.

Around 5% of the isolated cells from a skin biopsy proliferate in a culture and show the capacity to form neural cells. With mesenchymal cells from the bone marrow, nearly 1/10,000 of adherent mononuclear cells (CD45-) produce a proliferating culture with multiple potentials. From these isolations, when placed in different cultures, 90% start becoming endothelia or neurons; 60% are positive albumin in cultures, which favors the development of hepatocytes. Some recent studies show that around 10% of a population enriched with stem cells from the umbilical cord blood can proliferate in a culture and can show a differentiation rank. Of all the cells that are proliferating, 50% can be positive for *in vitro* neural, endothelial, muscular or mesenchymal markers.

Isolated stem cells from different sources show similar differentiation rates. What distinguishes one cell from another, as a candidate for tissular therapy, is its capacity to proliferate, overcoming the low differentiation rates. Presently, embryonic stem cells possess the most efficient *in vitro* proliferation, but in the future it will be sought to achieve conditions that will allow to obtain higher proliferation levels of stem cells of specific tissue.

Are Stem Cells from Wharton's Jelly in the Umbilical Cord Multipotent?

The obtention of stem cells as of the human umbilical cord is an interesting alternative since the umbilical cord is a fetal organ, easy to obtain and to discard, which diminishes bioethical difficulties. The human umbilical cord is the organ in charge of the embryo's fetal placental circulation and nutrition. Inside it a mucous connective embryonic tissue is found, named Wharton's Jelly, which is surrounded by the vascular elements that conform it. In previous studies, the human umbilical cord was used as biological coating in burned patients (Banerjee and col., 1987) in which it was used as an apposite in experimental surgeries in dogs accelerating cicatrizing, incentivating tissular regeneration and favoring infection control (29). Because of these reasons, in the Institute Unit of Basic Oral Research

of El Bosque University, we are carrying out research to determine the presence of multipotent stem cells in Wharton's Jelly of the human umbilical cord (20) , in addition to the already described presence of stem cells in the umbilical cord blood.

Different markers that allow the *in vitro* characterization of stem cells such as the CD 34 molecule have been identified. This molecule, is characterized by stem cells and hematopoietic progenitor cells (31). Also the expression of the SB 10 molecule, a member of a family of molecules of the oocyte adhesion ALCAM is characterized (32). And so is the synthesis of the Ha collagen by cells precursor of chondrocytes (?) (22); and lastly, there is the presence of receptor 3 of the Fibroblast Growth Factor (FGFR 3) as marker of precursor mesenchymal precartilaginous cells (34, 35, 36, 37, 38). The family of the Fibroblast Growth Factors (FGF) participates in the regulation of the production of mesenchymal tissue (36). The acid and basic Fibroblast Growth Factors (FGF-1/FGF 2) belong to the family of growth factors that play an active role during the growth, differentiation and regeneration of a great variety of tissues. At least four high affinity receptors and their synthesized variants have been described by alternative splicing of the DNA m. The receptors of the Fibroblast Growth Factor are members of the tyrosine cinasa (?), which plays a crucial role during the growth and development of cartilaginous tissues (37, 38). The association of FGFR 3 with mensechym and the early bone and cartilage formation explains the characteristic aspects of diseases that involve mutations in this gene. The receptor 3 FGF gene (FGFR 3) is over expressed in Achondroplasia, a syndrome that involves anomalies in the physiology of mesenchymal stem cells (34, 36). The FGFR 3 protein is found in the peripheral cells of joints, expressing itself mainly in cells of the perichondrial area. This would probably indicate that the expression of FGFR 3 is observed in mesenchymal stem cells before differentiating itself (34, 35). The present chondrocytes (?) present in biopsy samples of human joint cartilage do not express FGFR 3. However, in a culture the cells go through a di-differentiation period thus allowing again the expression of FGFR 3; and they do not secrete the specific cartilagenous extracellular matrix (33, 36). Robinson and col. in 1999 demonstrated that precursor cells of the perichondrium and other precartilaginous cells that express receptor 3 of the Fibroblast Growth Factor (FGFR 3) are good cells to be implanted in the correction of defects in the joint (?) cartilage (33, 34, 35)

The presence of FGF 3 in isolated cells from the umbilical cord had not been described previously, a parameter to be underlined in an original article.

We then carried out our study using samples of umbilical cord from donor neonates, obtained after previous informed consent. Under conditions of sterility, Wharton's jelly was obtained, and two methods to obtain cells were tested: implanting 3 mm³ explants (?) or by enzymatic disassociation. (Microphotography 1). The dynamics of celular proliferation was analyzed in the cultures through the immuno detection of Bromodeoxiuridine (BrdU), and besides, through immunocytochemistry (?) the expression of receptor 3 for the Fibroblast Growth Factor (FGFR 3 as marker for conjunctive progenitor cells) was evaluated. (Microphotography 2). The percentage of cells that entered phase S in primary cultures was 19.07% \pm 5.45, and 24.01% \pm 12.11 and 26.02% \pm 4.65 in sub cultures one and two respectively (Chart 1). Immunoreactivity for FGFR 3 was located in most of the cells in nuclei and cytoplasm (73.90% \pm 3.80); in a lesser percentage only in the nucleus (17.74% \pm 0.13); and scarcely only in cytoplasm (0.22% \pm 0.13). The expression of the FGFR 3 factor in the nucleus increases in subcultures (Chart 2).

This system allowed to obtain viable cells and opens up the door to be able to differentiate them *in vitro* with therapeutical purposes and potential applications in pathologies involving cartilaginous tissues (degenerative arthritis) or illnesses widely involving the bones (osteosarcomas) (20).

Because of this, we will continue our research with the application of different *in vitro* stimuli, such as specific soluble factors, to different concentrations in several periods of time to the isolated mesenchymal precursor stem cells of Wharton's jelly of the human umbilical cord. If these mesenchymal precursor stem cells are endowed with primordial properties and characteristics, they will be an essential tool for the development of new therapeutical strategies geared towards the treatment of diverse illnesses in clinical practice according to the individual patient's clinical needs and his or her physiological conditions.

Bioethical considerations

The use of embryonic stem cells as celular and tissular therapeutics is, in the end, limited by ethical aspects, since these cells come from human embryos. The need to carry out a HLA typification to tissues derived from embryonic stem cells in order to effect allogenic transplants would require in the future the production and storage in a highly specialized cell bank, of several thousands of lines of embryonic stem cells so tissular therapy and regenerative medicine are viable. This requirement demands hundreds of thousands of

embryos, due to the fact that to isolate embryonic stem cells as of human embryos is, up to now, an inefficient and impractical process due to the numerous ethical problems originated. Because of this, it is believed that a non embryonic source of stem cells would help overcome the bioethical conflicts associated with the use of embryonic stem cells. From the studies carried out with adult stem cells, the ones that call more our attention are those dealing with umbilical cord stem cells, as they are obtained from material that is discarded after delivery. This way, it can be concluded that the development of several thousands of blood samples from the umbilical cord geared to solve the HLA compatibility problem is more practical, as it depends only on the number of deliveries in a specific area, and on the parents' consent to donate the blood from the umbilical cord.

CONCLUSIONS

In a natural manner, body tissues throughout life suffer some deterioration, from which they defend themselves by developing the intrinsic capacity to remodel those tissues that are wearing out. Should this regeneration do not exist, life expectancy of living beings would be reduced considerably. On the other hand, diverse illnesses affecting the human being are based on the degeneration and death of the different tissues conforming our body, be this in an acute manner (infarcts) or in a chronic one (degeneration, aging). The advancement of medicine has developed techniques that manage to repair tissues through transplants. However, new possibilities are breaking through. The new regenerative medicine, which has set out to regenerate from the structural/functional point of view, and not only to repair damaged tissues, using mechanisms similar to those which in the natural way that the organism uses for such a purpose and, due to the speed of the damage, it is not capable of doing in an efficient way. Stem cells then start playing a very important role.

There is no doubt that these new discoveries will be a decisive strategic point in the field of the new medical treatments. Regenerative medicine, based on the therapeutical use of stem cells forestalls the increase in the incidence of degenerative diseases irreversibly associated to the increase in world-wide life expectancy and the population's aging (1, 4).

All this in addition to the new knowledge in embryology and in developmental biology, of the new ways of signaling and of the biochemical and biophysical mechanisms that unleash the formation of diverse tissues for their potential use in tissular or celular therapy.