



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**  
**ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**Programa de Especialidad en Hematopatología**

**Papel de las células tallo en el trasplante**

**TESINA**

**Que para obtener el diploma de  
Especialidad en Hematopatología  
Presenta:**

**QBP Vicente Aguilar García**

**Director: Dr. Jorge Vela Ojeda**

# **PAPEL DE LAS CELULAS TALLO EN EL TRANSPLANTE**

## **INDICE**

|   |    |
|---|----|
| Indice de figuras   | i  |
| Abreviaturas  | ii |
| Resumen   | 5  |
| Objetivo y Justificación  | 6  |
| I. Introducción   | 7  |
| II. Historia  | 22 |
| III. Descripción del linaje celular   | 22 |
| IV. Experimentos  | 24 |
| V. Plasticidad  | 27 |
| VI. Inducción de la diferenciación con citocinas y usos terapéuticos<br>de las células CD 133 | 28 |
| VII. Conclusiones   | 32 |

## INDICE DE FIGURAS

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Figura 1 | Esquema de la Hematopoyesis   | 3  |
| Figura 2 | Modelo de la diferenciación de células madre embrionarias y adultas a lo largo de la línea germinal | 11 |
| Figura 3 | Ilustración de la estructura propuesta del antígeno CD133.  | 17 |
| Figura 4 | Regeneración de tejido cardíaco infartado debido a células madre adultas tomadas de médula ósea.    | 20 |
| Figura 5 | Mecanismos potencialmente beneficiosos del tratamiento con células madre                            | 24 |

## ABREVIATURAS

| Abreviatura | Significado   |
|-------------|---|
| DNE         | Donante no emparentado                                      |
| EICH        | Enfermedad injerto contra huésped                           |
| G-CSF       | Factor estimulante de crecimiento de colonias granlocíticas |
| VEGF        | Factor de crecimiento endotelio vascular.                   |
| MSC         | MESENCHIMAL STEM CELL                                       |
| PH          | Progenitores hemtopoyéticos                                 |
| TPH         | Transplante de progenitores hematopoyéticos                 |

## RESUMEN

En el adulto, la médula ósea es el lugar de formación de los elementos sanguíneos, debido a su capacidad de permitir el anidamiento, el crecimiento y la diferenciación de las células germinales pluripotentes.

Existen células hematopoyéticas conocidas también como CFU-GEM MegL, debido a su capacidad de producir in vitro colonias constituidas por granulocitos, eritrocitos, monocitos, megacariocitos y linfocitos T y B.

A partir de la CFU-LM aparece la célula germinal linfoide (CFU-L) y la célula germinal mieloide.

Las células madre, células troncales o células tallo son células indiferenciadas, no comprometidas con un linaje, capaces de autorenovarse y diferenciarse en estirpes celulares específicos de un tejido.

Se han descrito diferentes tipos de células madre en la médula ósea: Hematopoyéticas, mesenquimales, y células progenitoras adultas multipotenciales.

Las células madre hematopoyéticas de médula ósea y sangre periférica, también son capaces de contribuir a la angiogénesis in vivo, de tal forma, que estas células contienen progenitores hematopoyéticos y endoteliales.<sup>3</sup>

En cuanto a las células precursoras se refiere, el antígeno CD133 es un marcador de las células pluripotenciales hematopoyéticas lo constituye una proteína de 120 kD de la familia de las glicoproteínas transmembranales pentaspán. Se expresa en poblaciones celulares inmaduras tales como las CD34 y células progenitoras, células madre neurales y endoteliales así como en retina, retinoblastomas y epitelio en desarrollo.

Las células multipotentes existen en diversos tejidos de los adultos, siendo estas, primeramente aisladas de la médula ósea, esta es la fuente más frecuentemente usada para su aislamiento, aunque han sido identificadas también, en piel, vasos sanguíneos, músculo y cerebro. De cualquier forma es muy difícil aislar y mantener vivas las células multipotentes fuera del organismo.

El tejido adiposo permite la extracción de volúmenes considerables que implican una alternativa como fuente de células madre. Las células madre multipotentes derivadas de los adipocitos (MADS) presentaron capacidad de autorrenovación in vitro, exhibiendo un cariotipo diploide normal y manteniendo la capacidad para diferenciarse en diversos tipos de células mesenquimales.

El uso actual que se da a las células CD133 es de suma importancia, ya que debido a su capacidad de autorrenovarse y diferenciarse en células de distintas clases de tejidos, como el cardíaco, células neurales, hueso, células hematopoyéticas ha sido utilizado con mayor frecuencia para el tratamiento de infartos, enfermedades neurológicas como Alzheimer y enfermedad de Parkinson y diabetes<sup>3</sup>, teniendo un amplio horizonte de investigación en el posible uso como terapéutica. Los anticuerpos CD 133 serán usados para seleccionar células madre y progenitoras hematopoyéticas para estudios de trasplantes como una alternativa a las más frecuentemente usadas CD34<sup>+</sup>.

## **OBJETIVO**

Realizar una revisión de artículos acerca de células Tallo CD 133+ y CD 34+ con el fin de conocer su utilización en los tratamientos médicos en distintas patologías.

## **JUSTIFICACION DEL TRABAJO**

El presente trabajo tiene la finalidad de conocer los avances en la investigación de las células Tallo, enfocada especialmente al estudio de las células precursoras y hematopoyéticas en el ámbito laboral.

## I.- INTRODUCCION

Antes de tratar el tema de las células tallo con relación al trasplante es necesario abordar la hematopoyesis y conocer las distintas estirpes que se presentan en el tejido hematopoyético. En el adulto, la médula ósea es el lugar de formación de los elementos sanguíneos, debido a su capacidad de permitir la nidación, crecimiento y diferenciación de las células germinales pluripotentes. La médula ósea es un tejido blando que contiene sangre, grasa y células hematopoyéticas, el nivel de hematopoyesis puede incrementarse de 2 a 8 veces cuando existe una demanda periférica excesiva.

En la médula ósea, se deben distinguir las células hematopoyéticas propiamente dichas y los elementos celulares del estroma, que incluyen las células endoteliales vasculares y las células reticulares, las cuales con sus prolongaciones fibrosas constituyen el armazón sobre el que se sitúan las células hematopoyéticas. La célula reticular proviene del mesénquima, a nivel de los senos se constituyen en células adventicias, pudiendo acumular grasa y transformarse en adipocitos que derivan de una célula precursora de fibroblastos (CFU-F). Los adipocitos pueden adquirir un tamaño de hasta 40  $\mu\text{m}$  y constituyen el componente celular mayoritario de la médula amarilla. Existen células hematopoyéticas no reconocibles mediante técnicas microscópicas, debido a que no presentan distintivos anatómicos precisos. Se trata de células mononucleares pequeñas, agranulares, semejantes a células linfoides pequeñas, cuya cuantificación se cifra en una por cada dos mil elementos medulares nucleados, denominada CFU-LM o célula madre linfomieloide, conocida también como CFU-GEM MegL, debido a su capacidad de producir *in vitro* colonias constituidas por granulocitos, eritrocitos, monocitos, megacariocitos y linfocitos T y B<sup>12</sup>.

A partir de la CFU-LM aparece la célula germinal linfoide (CFU-L) y la célula germinal mieloide.

La célula germinal mieloide produce, bajo la influencia del microambiente medular, las células germinales comprometidas para una determinada línea celular (granulocítica, monocítica, eritroide y megacariocítica). A dichas células se las conoce como unidades formadoras de colonias (CFU). La proliferación y diferenciación de estas células comprometidas requiere la presencia de un factor estimulante

específico para cada una de ellas. Así para la línea eritroide es la eritropoyetina, hormona segregada por el riñón. Para la línea granulopoyética es el denominado factor estimulante de colonias granulomonociticos (CSF-GM), dicha sustancia se halla en ciertos líquidos biológicos, en pulmón y placenta y en los macrófagos y monocitos de sangre periférica. La serie megacariocítica está regulada fundamentalmente por la trombopoyetina o factor estimulante de la trombopoyesis (TSP), que se halla en el plasma humano. La célula comprometida para la granulopoyesis (CFU-GM) prolifera y madura bajo la acción del CSF-GM, originando posteriormente el mieloblasto y el monoblasto. La serie eosinófila tiene un progenitor específico la CFU-Eo, que es estimulada por un factor producido fundamentalmente por los linfocitos T, denominado CSF-Eo, bajo el efecto de dicho factor se producen la proliferación y diferenciación hacia el primer elemento de la serie morfológicamente reconocible, el mielocito eosinófilo. Lo mismo ocurre con la serie basófila, a la célula comprometida se le denomina CFU-Ba, y al factor estimulante CSF-Ba que es el menos conocido de los factores de la granulopoyesis.

La célula comprometida para la megacariopoyesis, denominada CFU-Meg, está estimulada por la trombopoyetina y origina los megacariocitos responsables de la formación plaquetaria<sup>12</sup>.

Desde el punto de vista morfológico existen ciertas características generales de las células hematopoyéticas que nos ayudan a reconocer su estadio de maduración. Así, las células inmaduras son de gran tamaño y poseen una relación núcleo-citoplasma elevada, la cromatina es laxa y poseen uno o varios nucléolos. El citoplasma es basófilo y está desprovisto de características diferenciales de una determinada línea celular. A medida que las células maduran se reducen de tamaño, la relación núcleo-citoplasma disminuye, desaparecen los nucléolos y aparecen en el citoplasma las características morfológicas propias de cada línea hematopoyética<sup>12</sup>.



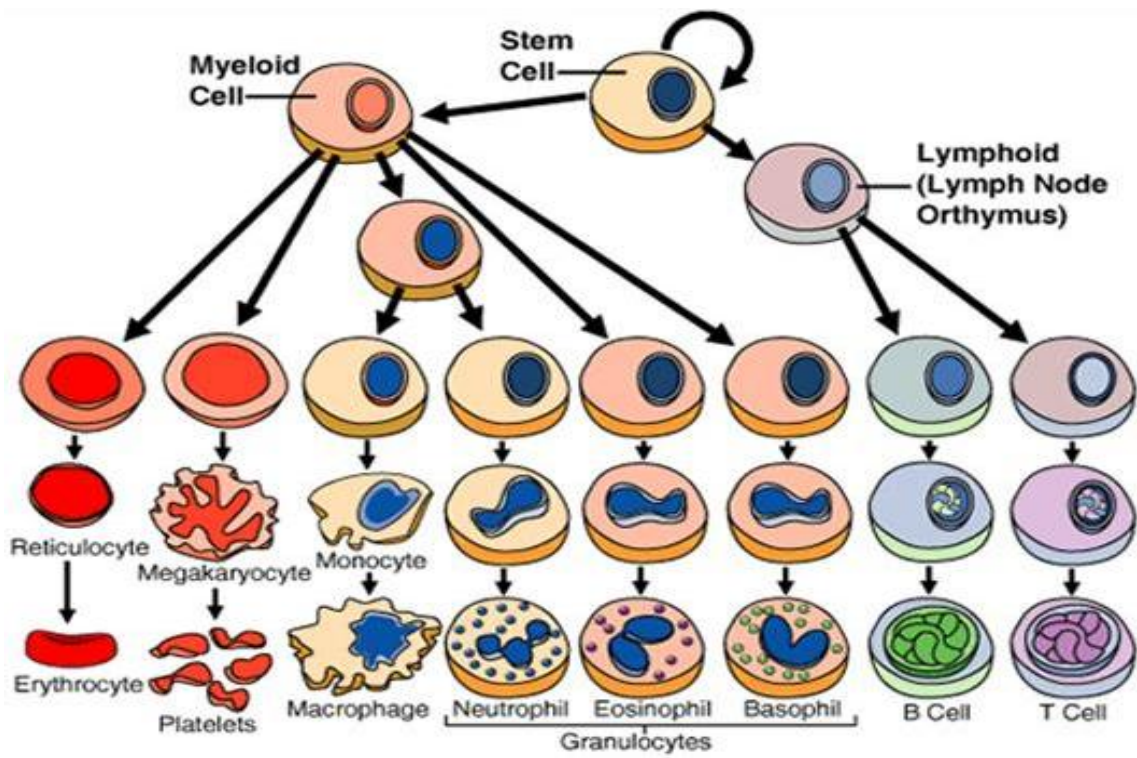
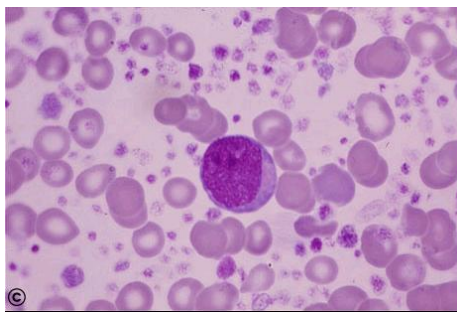
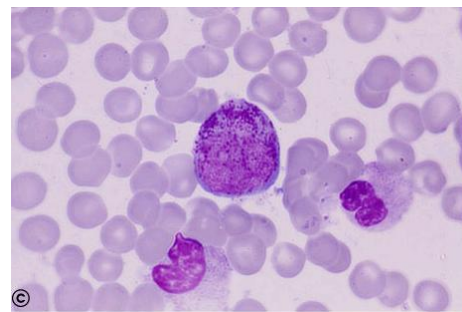


FIGURA 1. ESQUEMA DE LA HEMATOPOYESIS

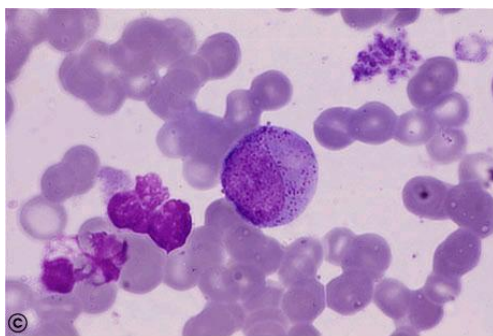
SERIE MIELOIDE GRANULOCITICA NEUTROFILA



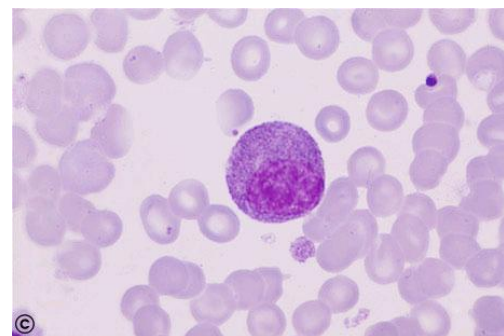
1 Hemocitoblasto



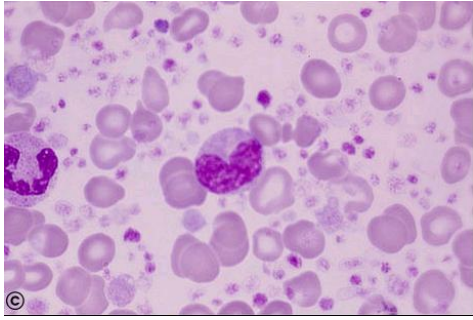
2 Mieloblasto



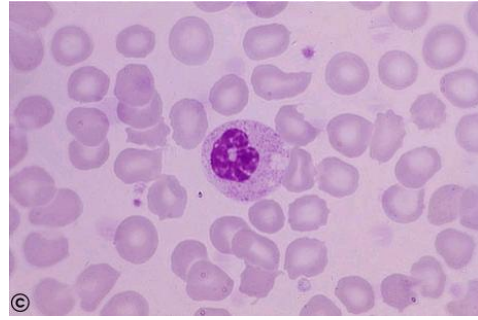
3 Promielocito neutrofilo



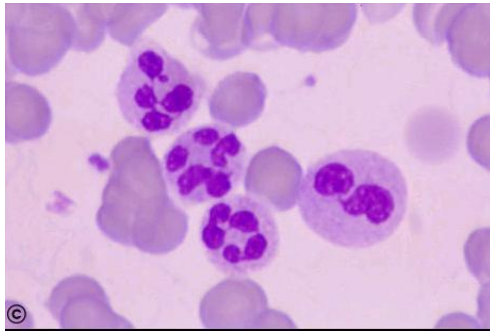
4 Mielocito neutrofilo



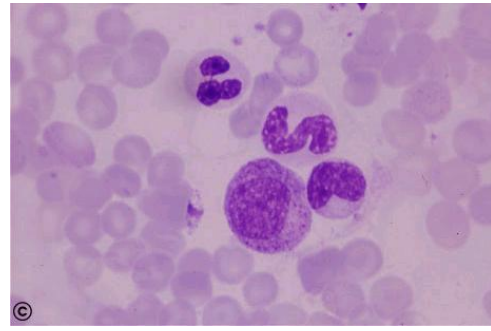
5 Metamielocito neutrofilo



6 Neutrófilo en banda

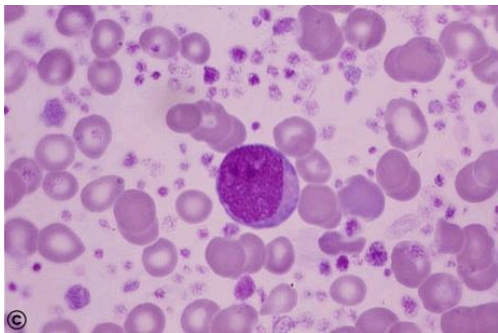


7 Neutrófilo segmentado

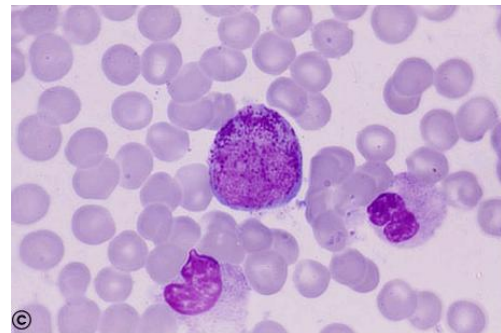


8 Neutrófilos: mielocito, metamielocito, banda, segmentado

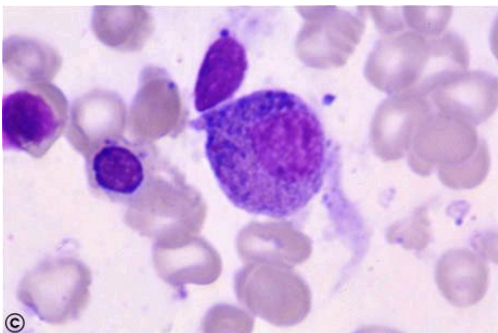
#### SERIE MIELOIDE GRANULOCITICA EOSINOFILA



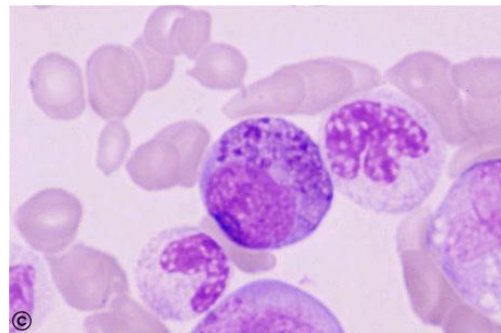
1 Hemocitoblasto



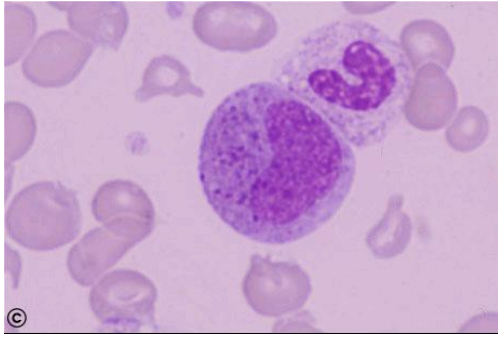
2 Mieloblasto



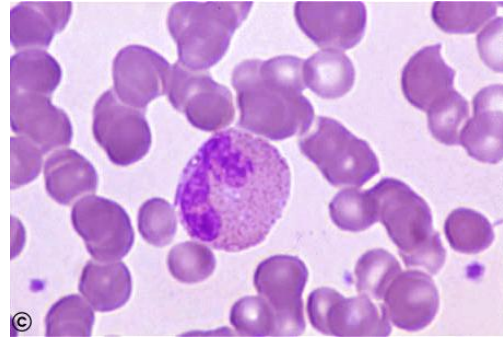
3 Promielocito eosinófilo



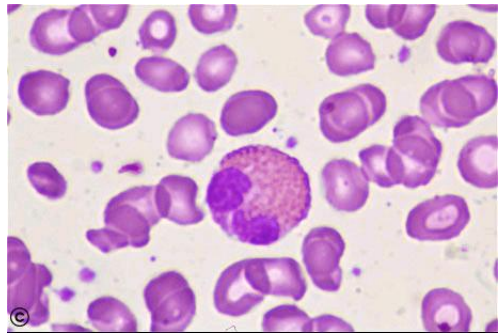
4 Mielocito eosinófilo



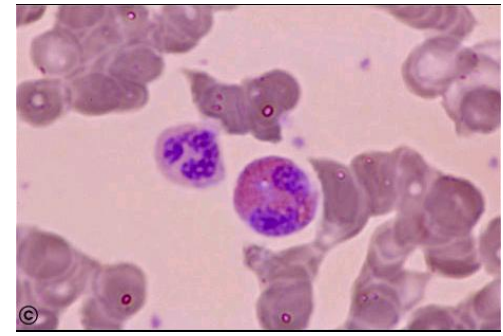
5 Metamielocito eosinófilo



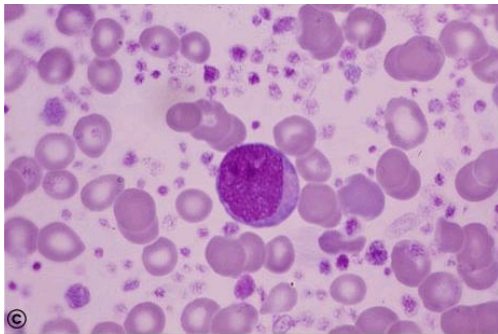
6 Eosinófilo en banda



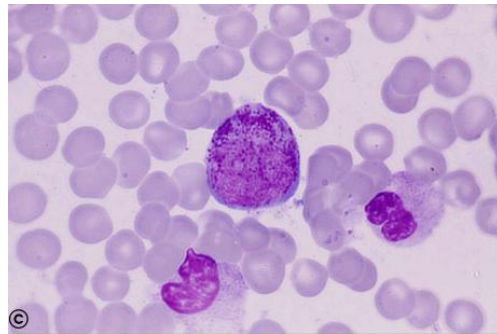
7 Eosinófilo segmentado



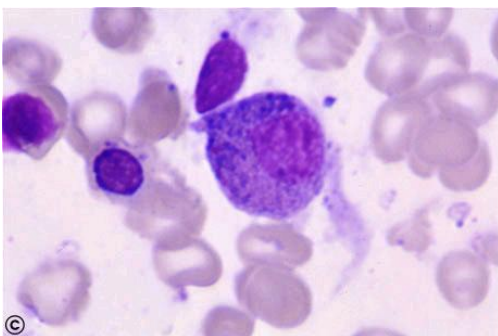
8 Eosinófilo segmentado



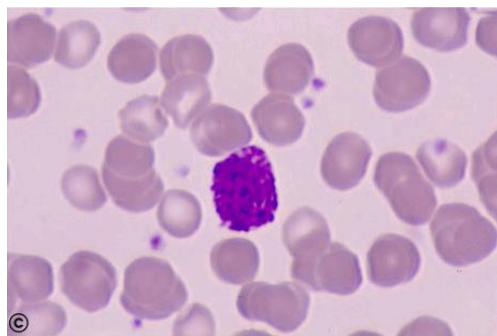
1 Hemocitoblasto



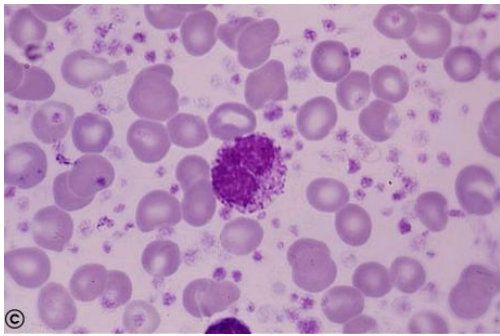
2 Mieloblasto



3 Promielocito basófilo

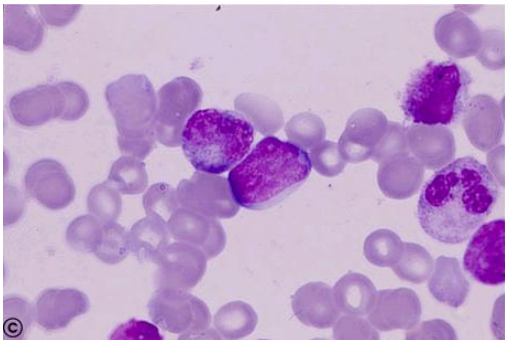


4 Mielocito basófilo

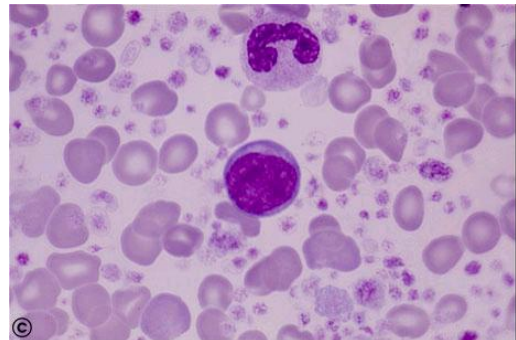


5 Basófilo segmentado

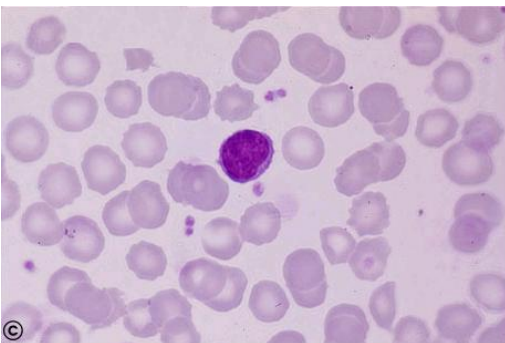
SERIE LINFOCITICA



1 Linfoblasto

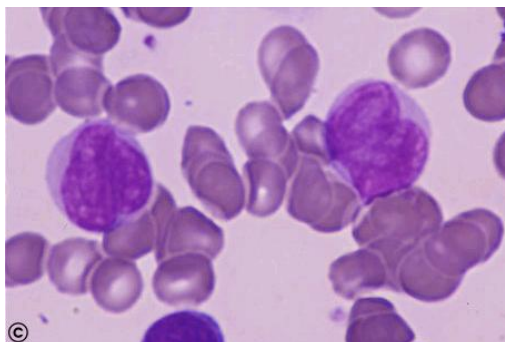


2 Prolinfocito

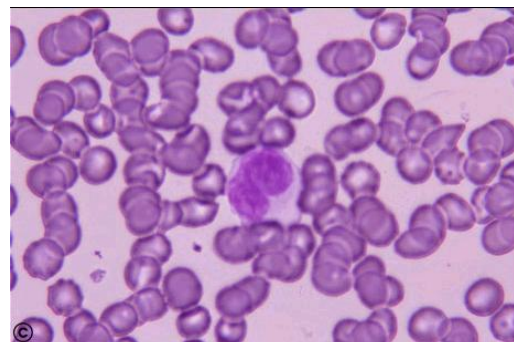


3 Linfocito

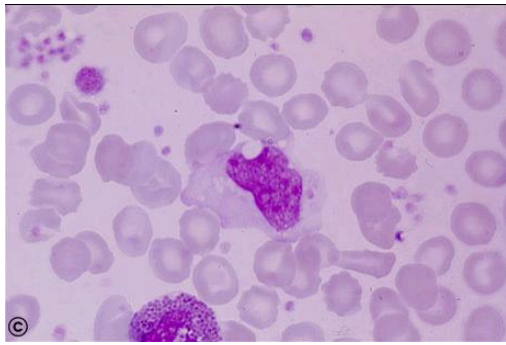
SERIE MONOCITICA



1 Monoblasto

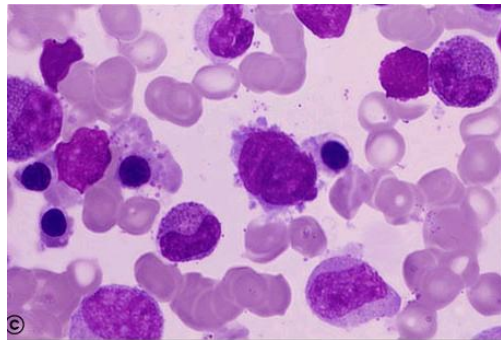


2 Promonocito

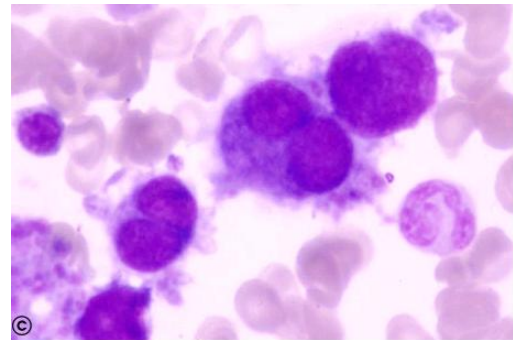


**3 Monocito**

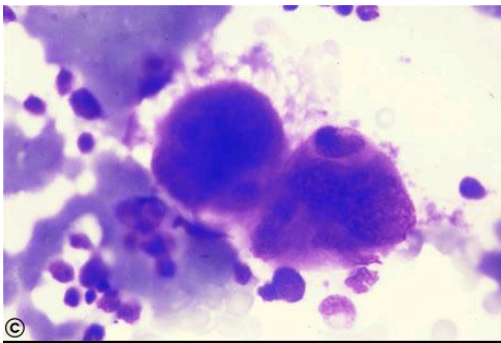
**SERIE MEGACARIOCITICA**



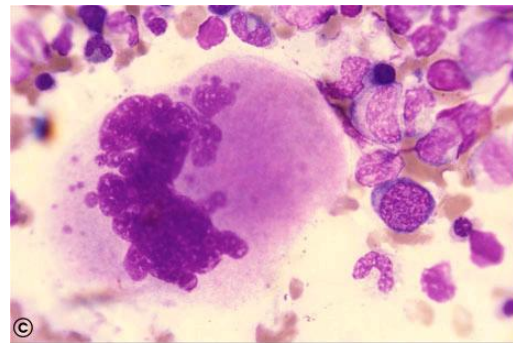
**1 Megacarioblasto**



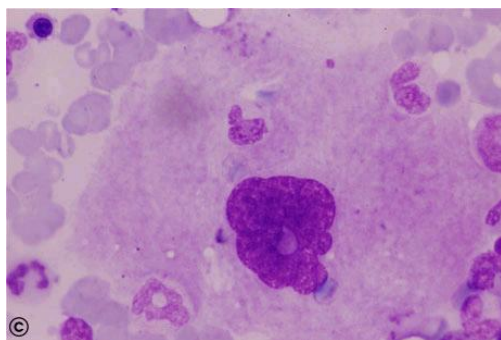
**2 Promegacariocito**



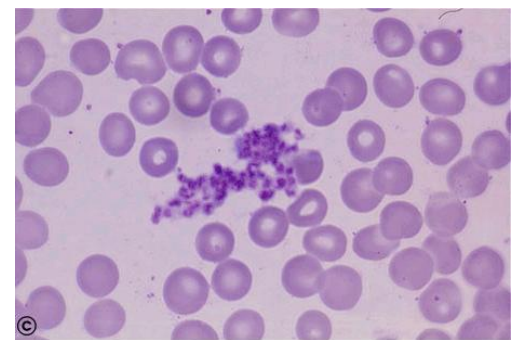
**3 Megacariocito**



**4 Megacariocito**

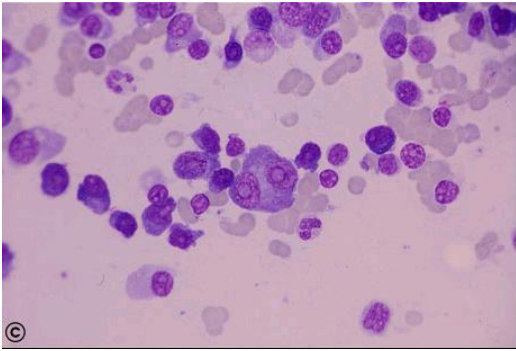


**5 Megacariocito**

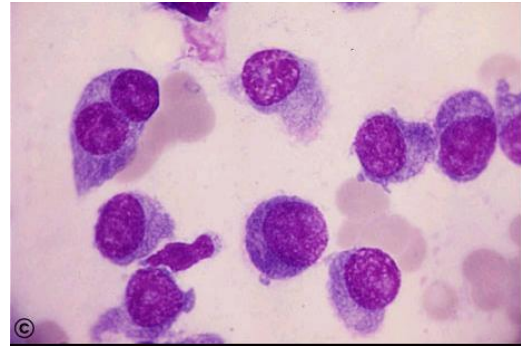


**6 Plaquetas**

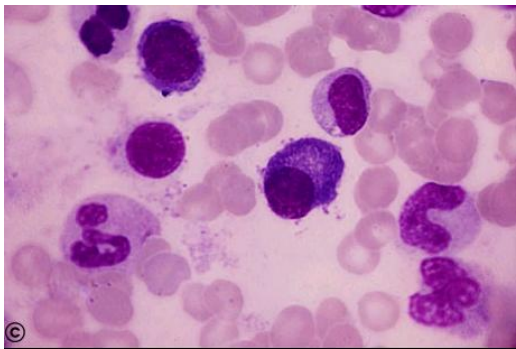
**1 CELULAS PLASMATICAS**



**1 Plasmoblasto**

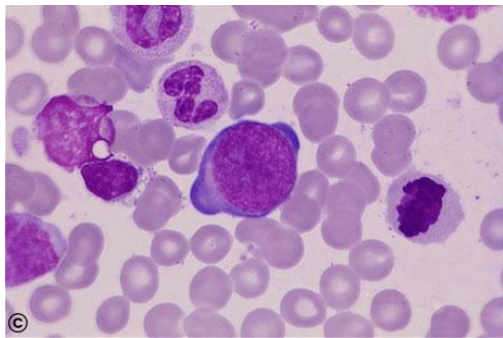


**2 Proplasmocito**

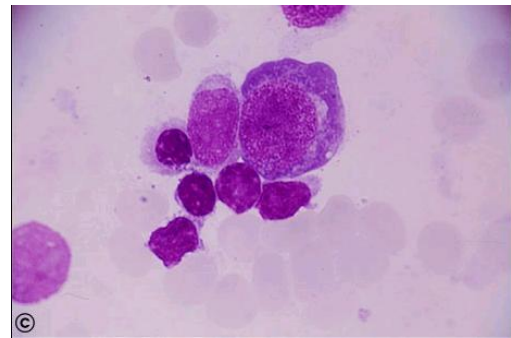


**3 Plasmocito**

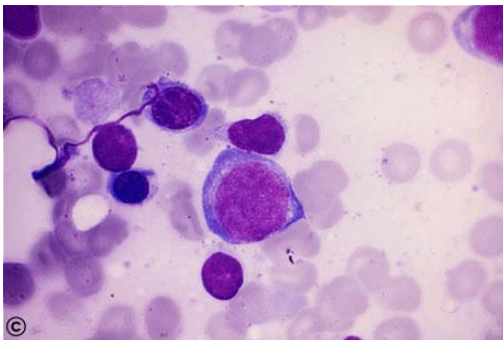
**SERIE MIELOIDE GRANULOCITICA ERITROIDE**



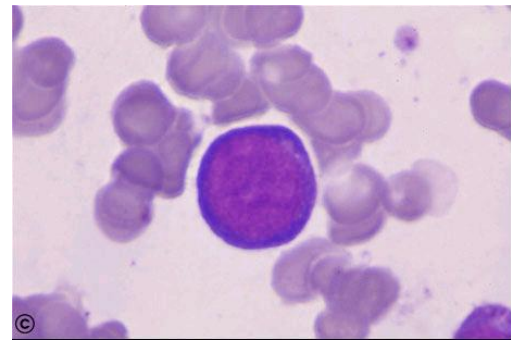
**1 Proeritroblasto**



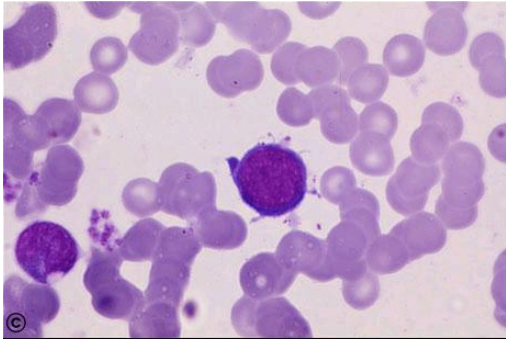
**2 Proeritroblasto**



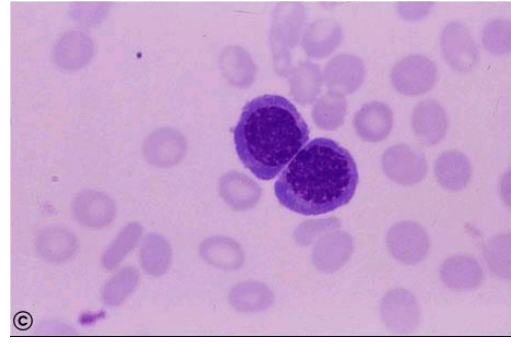
**3 Proeritroblasto**



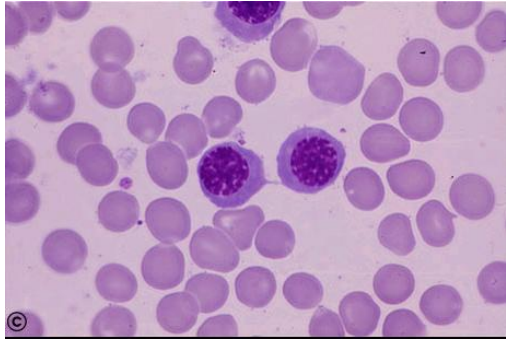
**4 Eritroblasto basófilo**



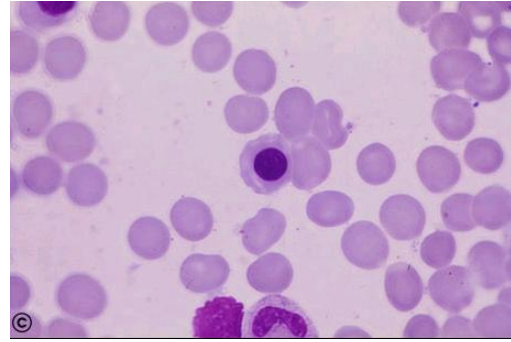
**5 Eritroblasto basófilo**



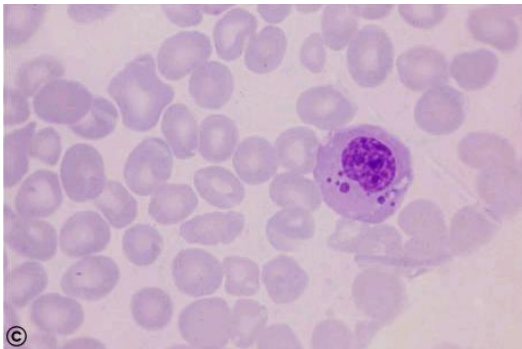
**6 Eritroblasto policromático**



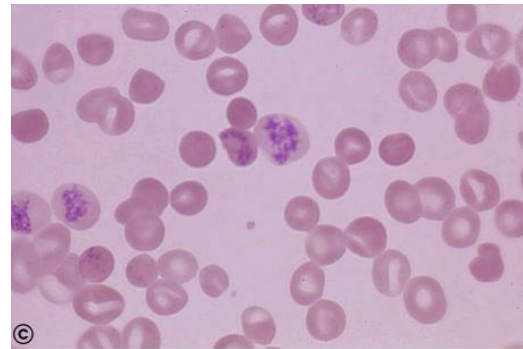
**7 Eritroblasto policromático**



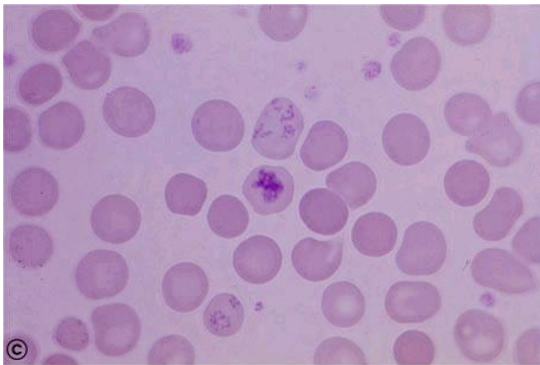
**8 Eritroblasto ortocromático**



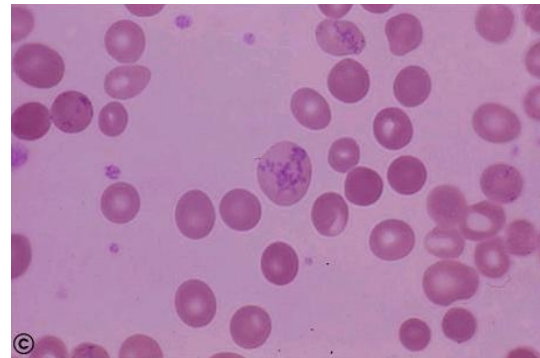
**9 Eritroblasto ortocromático**



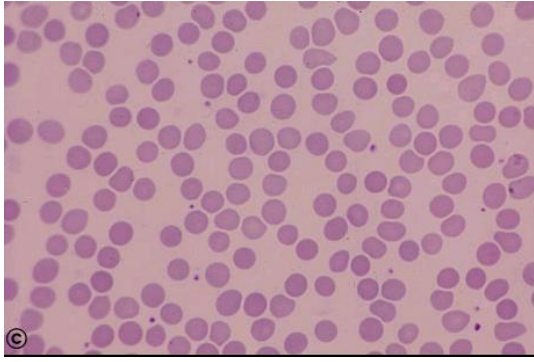
**10 Reticulocitos**



**11 Reticulocitos**



**12 Reticulocitos**



13 Eritrocitos

Las células madre, células troncales o células tallo son células indiferenciadas, no comprometidas con un linaje, capaces de autorrenovarse y diferenciarse en estirpes celulares específicos de un tejido<sup>14</sup>. El principio biológico que subyace en el uso de células madre es el fenómeno de diferenciación dirigida por tejido, por ejemplo: las células madre aisladas del tejido hepático y reinyectadas en el hígado, llegan a ser hepatocitos, mientras que estas mismas células inyectadas en el miocardio, se convierten en miocitos. Las células madre **totipotenciales** son capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario; las células tallo embrionarias son **pluripotenciales** capaces de generar todas las poblaciones celulares del organismo, tienen la habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias y células tallo somáticas **multipotenciales** capaces de generar los diferentes tipos celulares dentro de un tejido específico, es decir, procedentes de la misma capa embrionaria.<sup>2,3</sup> Es importante hacer notar que para que una célula sea considerada pluripotencial, debe cumplir con los siguientes criterios: 1) una sola célula debe ser capaz de diferenciarse a células especializadas procedentes de cualquier capa embrionaria; 2) demostrar la funcionalidad *in vitro* e *in vivo* de las células a las que se ha diferenciado y por último, que se produzca un asentamiento y efecto de estas células sobre el tejido diana o blanco<sup>2</sup>.

Se han descrito diferentes tipos de células madre en la médula ósea: Hematopoyéticas, mesenquimales y células progenitoras adultas multipotenciales.

Las células madre hematopoyéticas de médula ósea y sangre periférica, también son capaces de contribuir a la angiogénesis *in vivo*, de tal forma, que estas células contienen progenitores hematopoyéticos y endoteliales.<sup>3</sup>

Las células madre mesenquimales o estromales presentan distintos marcadores de superficie tales como SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90 y CD106. Estas células no expresan antígenos típicos de las células madre hematopoyéticas, como CD34,



CD45 o CD41. Se ha demostrado que estas células son capaces de diferenciarse a tejidos mesodérmicos funcionales, como osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos esqueléticos.

Se estima que la médula ósea del humano produce alrededor de  $10^{11}$  células sanguíneas por día, las cuales se derivan de las células madre pluripotenciales mediante la diferenciación de progenitores intermedios que muestran invariablemente, un incremento en la expresión de marcadores de linaje. Se ha estimado a través de modelos matemáticos que las células pluripotenciales se dividen una vez cada 1 a 2 años, aunque el mecanismo de autorrenovación y diferenciación no es claro<sup>1</sup>.

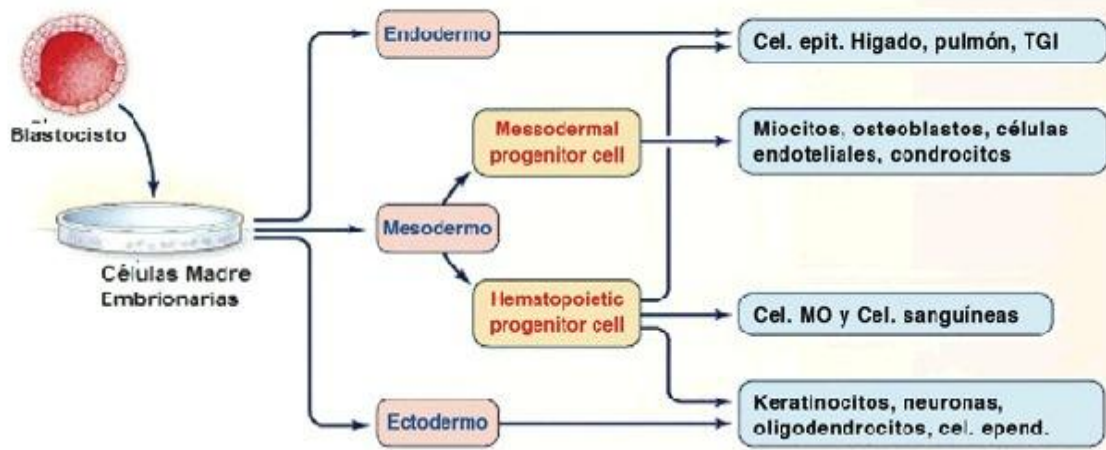


Figura 2. Modelo de la diferenciación de células madre embrionarias y adultas a lo largo de la línea germinal<sup>3</sup>

El trasplante de progenitores hematopoyéticos consiste en la administración de un tratamiento citotóxico con dosis altas de quimioterapia y/o radioterapia (tratamiento mieloablatoivo), que intenta la erradicación de enfermedades hematológicas y la inmunosupresión del receptor, seguida de la infusión intravenosa de células progenitoras hematopoyéticas extraídas del propio paciente (trasplante autólogo) o de un donante (trasplante alogénico), con el objetivo de restaurar los efectos letales que tiene esta terapia sobre la hemopoyesis normal. Para realizar el trasplante de progenitores hematopoyéticos es imprescindible la similitud entre donante y receptor, lo cual evita el rechazo o la enfermedad injerto contra huésped (EICH);

esta similitud o compatibilidad está dada por el sistema de antígenos leucocitarios humanos (HLA), que es un conjunto de proteínas que se expresan en la superficie de las células y que median las interacciones celulares en el reconocimiento de antígenos extraños. La mayoría de estas proceden de genes polimórficos localizados en el brazo corto del cromosoma 6, y se dividen en antígenos de clase I codificada por genes localizados en los loci A, B y C. Estos antígenos están formados por dos cadenas, una pesada (alfa) de glicoproteína con dominios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  y una cadena ligera  $\beta$  (beta) cuya secuencia de aminoácidos es idéntica a la de la beta-2-microglobulina. Encontrándose en todos los tejidos, donde constituyen un factor importante en el desarrollo de fenómenos de rechazo en los trasplantes de tejidos, ya que interactúan con los linfocitos T citotóxicos (CD8) y antígenos de clase II codificados por genes ubicados en los loci DR, DQ y DP; que están constituidos por dos cadenas de glicoproteínas distintas, denominadas alfa y beta (DRA, DQA, DPA, DRB, DQB, DPB). Las cadenas DR $\beta$  son las más pólímórficas y proceden de cuatro genes distintos denominados DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5, existiendo más de 220 alelos distintos solo para el gen DRB1. Se localizan en las membranas celulares de los linfocitos B, los linfocitos T activados, los monocitos, macrófagos, células dendríticas primitivas, células hematopoyéticas y de algunas células tumorales. Desempeñan un papel primordial en la fase inicial de la respuesta inmune en la que tiene lugar el reconocimiento de los antígenos HLA no propios mediante su interacción con las células T CD4.<sup>6</sup> El aspecto más relevante sobre la selección del donante no emparentado (DNE) idóneo, es el grado de histocompatibilidad HLA que causa un efecto directo sobre la supervivencia del Trasplante de Progenitores Hematopoyéticos (TPH). Los antígenos HLA que se consideran claves en la producción de aloreactividad y que han demostrado tener un impacto en la supervivencia, son el HLA A, B, C y DRB1. No se considera actualmente al HLA-DP un antígeno básico, además muestra un leve desequilibrio de unión con HLA A, B, DR y DQ, lo que explica que en los DNE HLA A, B, DRB1 y DQB1 idénticos, menos del 20% sean HLA DP idénticos. El impacto en el TPH de DNE respecto a identidad o disparidad del HLA DRB3, DRB4 y DRB5 se desconoce, mientras que, el impacto de HLA DQB1 es incierto. Dado que HLA DQB1 está estrechamente ligado a DRB1, es difícil demostrar un efecto independiente del DQB1. Por ello actualmente el donante ideal a buscar es aquel que son idéntico a nivel alélico para HLA A, B, C y DRB1. La elección del DNE incluye además de la máxima compatibilidad HLA, serología CMV, sexo y edad del donante, isogrupo

ABO (mayor compatibilidad). La obtención de PH de médula ósea es cada vez menos frecuente y el objetivo es obtener entre  $2 \text{ y } 4 \times 10^8$  células mononucleares (CMN) por Kg de peso del paciente.

En la obtención de Progenitores Hematopoyéticos de Sangre Periférica en condiciones basales, existe un mínimo porcentaje de progenitores circulantes, debido a la existencia de una continua migración e intercambio de células madre entre la médula ósea y otros órganos como el hígado y el bazo. Para identificar estos progenitores se emplea la expresión del antígeno CD34 en su membrana. El porcentaje de células CD34+ en situación basal en médula ósea, es 1 a 3% y en sangre periférica, de aproximadamente 0.06%<sup>6</sup>. Aunque este último porcentaje puede aumentar, a niveles entre 20 y 100 veces, mediante la administración de factores de crecimiento tales como el G-CSF (factor estimulante de colonias granulocíticas), proceso conocido como movilización<sup>1</sup>. Existen dos tipos de G-CSF: el compuesto no glicosilado (filgrastim), recombinante procedente de *E. coli* siendo el más empleado, del que la dosis más frecuente es de  $10 \mu\text{g}/\text{Kg}/\text{día}$  subcutáneo, comenzando las aféresis entre el 5° y 7° día de su administración y manteniéndose hasta la finalización de estas. Se recomienda monitorear la cifra de CD34+ para iniciar la aféresis cuando se detecte el pico deseado, que generalmente es de 5-10 células CD34+/ $\mu\text{l}$  de sangre preaféresis en el donador; y la forma glicosilada (lenograstim) procedente de células de ovario de hámster. Otros factores menos empleados son: GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), SCF (stem cell factor), IL-3, Pixy-321 (proteína de fusión de IL-3 y GM-CSF).<sup>6</sup> Las células progenitoras de médula ósea movilizadas a sangre periférica se extraen del donador mediante leucaféresis.

Una vez obtenidos los progenitores de sangre periférica, es necesario evaluar el potencial de injerto y restablecimiento de la hematopoyesis del producto. Las células que expresan CD34 en su membrana son las que están involucradas en la proliferación y mantenimiento de la hemopoyesis<sup>6</sup>. El antígeno CD34, es una proteína integral de membrana de 90-120 kD que también se expresa en progenitores comprometidos con un linaje, y se identifica por medio de anticuerpos monoclonales específicos por citometría de flujo. Se sugiere que esta molécula funciona como regulador de la adhesión celular a las células del estroma del microambiente hematopoyético. Se estima que la frecuencia de CD34+ en sangre de cordón umbilical oscila entre 0.2 a 1%. Resulta interesante resaltar que su frecuencia en cordón umbilical, disminuye con la edad de gestación, así se ha

observado que a las 17 semanas suponen el 11% de las células mononucleares, mientras que a las 38 semanas son el 1% aproximadamente.

La separación celular basada en la coexpresión de otros antígenos permite obtener poblaciones celulares enriquecidas a partir de células más primitivas. Así, la expresión del antígeno CD38, aumenta con la diferenciación. Esta es una proteína de membrana de 45 kD cuya principal expresión se da en células plasmáticas, timocitos y células T activadas. Tan solo entre 1-10% de las células CD34+ son CD38. De tal manera que las células madre hematopoyéticas se encuentran en la subpoblación celular CD34+ CD38 y lin-, así mismo expresan el antígeno CD133, el cual no se encuentra después de la diferenciación; el Thy-1 (CD90), de 25 a 35 kD que juega un papel importante en la activación de las células T y además tiene una baja o nula expresión de c-kit o receptor de la célula madre (CD117). El CD45 de 220 kD, se expresa tras la diferenciación de los leucocitos y es importante en la traducción de señal vía tirosinofosfatasa<sup>3</sup>.

El paciente recibe quimioterapia en la que se utiliza con mayor frecuencia ciclofosfamida, originando un estado de aplasia, con el que se pretende erradicar las células malignas (acondicionamiento mieloablativo), después de lo cual se realiza el trasplante con una dosis umbral de  $1.5-2 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup>/kg de peso del paciente, siendo la dosis óptima de  $5 \times 10^6$  células CD34<sup>+</sup>/kg acelerando el injerto leucocitario y plaquetario, reduciendo las transfusiones y la hospitalización.<sup>6</sup>

Un injerto es rechazado porque existe un reconocimiento por parte de los linfocitos T citotóxicos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad MHC de clases I y II, expresadas en la superficie celular, aunque en las células madre esta expresión es mínima y aumenta con la diferenciación<sup>4</sup>. El TPH está indicado en leucemias agudas mieloides y linfocíticas que constituyen entre el 35 a 50% de los casos de aloTPH

La médula ósea contiene **células madre mesenquimales** también denominadas estromales, las cuales presentan distintos marcadores de superficie como SH2, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90 y CD10621. Las células mesenquimales, no expresan antígenos de superficie típicos de las células hematopoyéticas, se ha demostrado que son capaces de diferenciarse *in vitro* a tejidos mesodérmicos funcionales como osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos esqueléticos. Las células mesenquimales no se diferencian a tejido derivado del endodermo y por lo tanto, no se pueden considerar células madre puripotenciales.

El grupo de Catherine Verfaillie en el 2002, describió una población celular de la médula ósea conocida como **células progenitoras multipotenciales adultas (MAPC)**, estas son capaces de proliferar más de 120 divisiones celulares sin aparente envejecimiento ya que mantienen niveles altos de telomerasa durante todo el tiempo de cultivo. Estas células no expresan CD34, CD44, MHCI, MHC II, CD45 y c-kit; expresan niveles bajos de Flk-1, Sca-1 y Thy-1, y altos de CD13, SSEA-1 (ratón-rata) y SSEA-4 (humano), al igual que en las células madre embrionarias, se detecta la activación de los factores de transcripción Oct-4 nanog y Rex-1, factores necesarios para mantener la célula en un estado proliferativo e indiferenciado; *in vitro* pueden ser inducidas a diferenciarse a tejidos derivados del mesodermo como hueso, cartílago, adipocitos, músculo esquelético, estroma hematopoyético o endotelio. También han sido capaces de diferenciarse en hepatocitos y funcionar como tales, al producir urea, albumina, inducir el citocromo p450 con fenobarbital y almacenar glucógeno, también se ha demostrado la diferenciación de estas células en tejidos derivados del ectodermo como neuronas, astrocitos y oligodendrocitos<sup>2</sup>.

## **II.- HISTORIA**

A finales de los años 60's y principios de los 70's Friedstein et al describieron por primera vez una población de células adherentes de la médula ósea que formaban parte del estroma medular y que daban origen al microambiente hematopoyético, estas fueron denominadas unidades formadoras de colonias de fibroblastos CFU-F. En 1999 el grupo de Jackson y col., demostró utilizando técnicas de citometría de flujo, que las células aisladas a partir de médula ósea y músculo, podían diferenciarse a células con características de músculo cardíaco y endotelio, en un modelo murino de infarto de miocardio.

El estudio de las células troncales mesenquimales (MSC) comenzó en la década de los 70. Las células mesenquimales se localizan principalmente en la médula ósea.

## **III.- DESCRIPCION DEL LINAJE CELULAR**

El CD133, también conocido como Prominin 1, Prominin-like protein 1 o AC133, es un antígeno de las células pluripotenciales hematopoyéticas, es una proteína de 120 kD de la familia de las glicoproteínas transmembranales pentaspan. Se expresa en poblaciones celulares inmaduras tales como las CD34 y células progenitoras, células madre neurales y endoteliales así como en retina, retinoblastomas y epitelio en desarrollo. Sus sinónimos habituales son PROML1, AC133 o antígeno de las células pluripotenciales hematopoyéticas. La función del antígeno en el organismo es desconocida<sup>1</sup>.

El gen PROM 1 o PROML 1 codifica para la glicoproteína transmembranal CD133 de tipo pentaspán<sup>1</sup>, este antígeno aparentemente pertenece a una nueva familia cuya caracterización en ratón, fue una de las primeras descripciones de la estructura de una glicoproteína 5TM. Esta familia incluye miembros de varias y diferentes especies quizás homologas entre las que se incluyen los humanos, ratones, ratas, moscas y gusanos. La estructura de esta glicoproteína incluye un grupo amino intracelular, dos asas cortas intracelulares, dos vueltas largas extracelulares y un grupo carboxilo terminal intracelular.

La presencia del antígeno CD 133 no se ha demostrado en el tejido epitelial de adultos, sin embargo la fracción CD133 de médula ósea, sangre de cordón umbilical y sangre periférica, ha demostrado su eficiencia en modelos de xenotransplante y se ha observado que lo contienen la mayoría de los precursores de granulocitos macrófagos, NOD/SCID, CD34+ y precursores de células dendríticas.

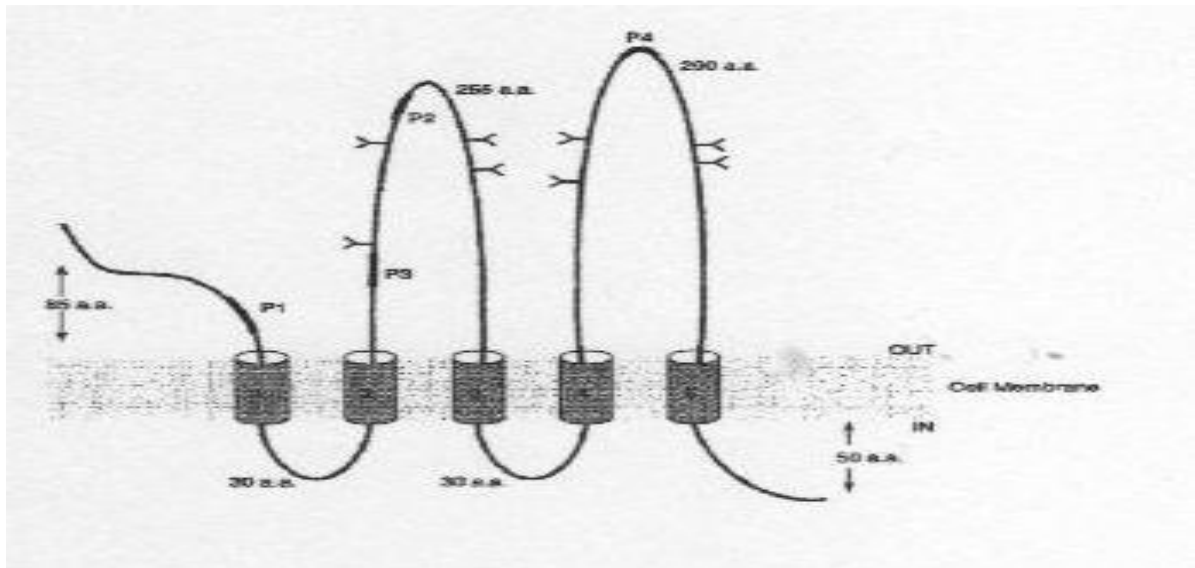


Figura 4.- Ilustración de la estructura propuesta del antígeno CD 133<sup>15</sup>.

Grafica del modelo estructural propuesto del antígeno CD133.

Esta proteína tiene un aminoácido extracelular n-terminal y un c-terminal citoplasmático

Muchas leucemias expresan el antígeno CD 133 así como el CD 34 pero algunos investigadores han encontrado en estas, blastos CD 133+ y CD 34 negativo. El marcador hematológico en células madre de origen humano más usualmente aislado es la sialomucina CD34, acorde con todos los protocolos clínicos y experimentales que envuelven propagación y transplante de células sanguíneas<sup>11</sup>.

El antígeno CD 133 se localiza en las microvellosidades y otras protuberancias de la membrana plasmática de las células progenitoras y en la superficie apical, pero no en la zona vasolateral de la membrana de algunas células epiteliales.

#### IV.- EXPERIMENTOS

Algunas evidencias indican que las propiedades de las células tallo hematopoyéticas (stem cell) pueden ser encontradas sobre células carentes de CD34 y marcadores de linaje (CD34<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>).

Una barrera en la caracterización de las células CD34<sup>-</sup> humanas, es la incapacidad para detectar esta población usando ensayos *in vitro* debido a que estas células solo demuestran actividad hematopoyética *in vivo*. Aunque la mayoría de las células CD34<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup> carecen de CD133 y expresan CD7, una población extremadamente rara de CD133<sup>+</sup>CD7<sup>-</sup> se ha identificado con una frecuencia de 0.2%, sorprendentemente esta fracción de células CD133<sup>+</sup>CD7<sup>-</sup> dentro de la subpoblación CD34<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>, es altamente eficiente en su actividad progenitora con una frecuencia equivalente a fracciones purificadas de CD34<sup>+</sup> y es la única población capaz de dar paso a la fracción CD34<sup>+</sup><sup>11</sup>. Gallacher y Murdoch en experimentos realizados utilizaron células humanas aisladas de cordón umbilical, purificadas por selección negativa, usando un coctel de anticuerpos contra marcadores de linaje y luego separadas; los ensayos de las células progenitoras fueron realizados colocando varias poblaciones celulares del orden de  $1 \times 10^2$  a  $1 \times 10^3$  células en una solución de metilcelulosa conteniendo 50 ng/mL de factor recombinante humano para células madre, 10 ng/mL de factor estimulante de colonias granulocíticas y macrófagos, 10 ng/mL de interleucina 3 y 3 U/mL de eritropoyetina recombinante humana, esta mezcla fue incubada a 37°C con 5% de dióxido de carbono en atmósfera húmeda. Las colonias fueron contadas después de 10 a 14 días por sus características morfológicas usando microscopio invertido; las células fueron incubadas a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en medio libre de suero, conteniendo insulina y transferrina, suplementado con B-mercaptoetanol, L-glutamina, factores de crecimiento de células madre humanas, interleucinas 3 y 6. Las células se transplantaron por vía intravenosa a ratones irradiados subletalmente NOD/SCID (*no obesos con inmunodeficiencia combinada severa*) después de ocho semanas del trasplante de cultivo *ex vivo* se detectaron células CD133<sup>+</sup> CD7<sup>-</sup> provenientes de la fracción CD34<sup>-</sup>CD38<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup> de origen humano en la médula ósea de estos ratones, mientras que la fracción CD133<sup>-</sup>CD7<sup>-</sup> no presentó éxito en el injerto o trasplante.

El grupo de Clarke y col., en el año 2000, probaron la existencia de células madre adultas pluripotenciales (MAPCs) de origen neural y su capacidad



diferenciadora, para lo cual inyectaron células madre neuronales o neuroesferas procedentes de un ratón transgénico para el gen reportero LacZ en embrión de ratón. Aproximadamente el 25% de los embriones presentaron quimerismo, no solo en el tejido neuronal, sino también en tejidos del mesodermo y del endodermo. Cuando estas mismas neuroesferas fueron inyectadas dentro de un blastocito de ratón, la contribución se extendió al sistema nervioso central, corazón, hígado, intestino y otros tejidos, sin embargo, no se evaluó en este trabajo la funcionalidad de las células donadas.

El grupo de Qu Petersen y col., en el 2001, ha sido capaz de aislar diferentes poblaciones de células madre musculares murinas basándose en su capacidad de adhesión y proliferación, estas células pueden mantenerse en cultivo durante más de 60 divisiones sin mostrar anomalías cromosómicas, siendo capaces de diferenciarse in vitro e in vivo a endotelio, músculo y células de linaje neuronal<sup>2</sup>.

Orlic et al., en el año 2001, en ratones ocluyeron la arteria coronaria izquierda y 5 horas después inyectaron las células madre. A los nueve días la presión telediastólica disminuyó 36% y disminuyó el remodelado ventricular, aunque hubo células madre que manifestaron el fenotipo fibrótico.

También se han realizado estudios con la movilización previa de células madre con citoquinas. Por ejemplo, Kocher et al, en el 2002, estimularon 30 días antes de provocar infartos en ratas mediante la administración de G-CSF y VEGF; luego, tras la oclusión de la arteria coronaria inyectaron las células madre derivadas de médula ósea<sup>3</sup>, dos días después se detectó el anidamiento de dichas células en el tejido miocárdico, 15 semanas después se encontraron nuevos vasos, disminución de células apoptóticas, el tejido infartado disminuyó de 36 al 12% y el gasto cardiaco mejoró de 26 a 48% con respecto a los controles<sup>3</sup> Figura 3.

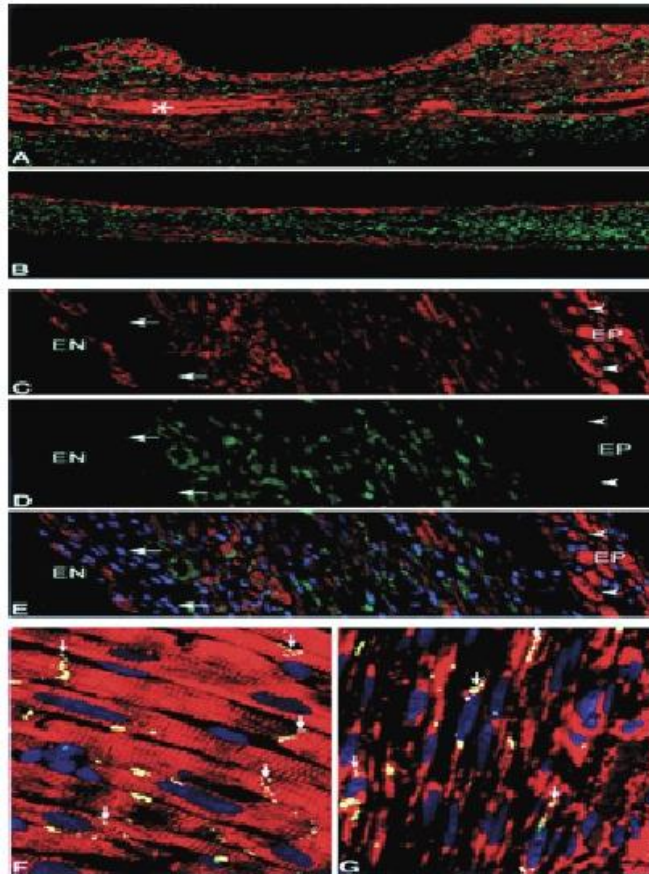


Figura 5. **La regeneración de tejido cardíaco infartado debido a las células madre adultas tomadas de médula ósea.** A) después de 9 días se observó regeneración parcial de la estructura y función cardíaca. Los asteriscos indican miocitos necróticos, el rojo es la miosina cardíaca, el verde son los núcleos marcados con yoduro de propidio de las células madre implantadas. B) No se evidenció regeneración del tejido desprovisto de células madre. C) Se evidencia nuevamente la miosina cardíaca. D) se muestra la proteína verde fluorescente. E) rojo es la miosina cardíaca, el verde la proteína fluorescente y el azul, los núcleos teñidos de yoduro de propidio. EP epicardio, EN endocardio. En el endocardio persisten zonas de infarto F) Un corazón adulto de control, que muestra los miocitos positivos para la conexina 43 y los discos intercalares (flechas). G) los miocitos jóvenes formados en el corazón infartado también muestran la conexina 43 en su citoplasma.

Orlic et al, en el 2001 también trabajaron con la estimulación preinfarto. Tomaron ratas y les administraron G-CSF 5 días preinfarto y 3 días post infarto. A los 21 días la mortalidad disminuyó el 68%, la zona de infarto 40%, la presión telediastólica a 26%. La fracción de eyección mejoró en forma progresiva, es decir a los 9 días un 48%, a los 16 días un 62% y a los 26 días un 114%. El incremento de nuevos miocitos fue de  $5 \times 10^6$ .

Stamm et al, en 6 pacientes a los que se les realizó un bypass coronario, inyectaron  $1.5 \times 10^6$  células autólogas mononucleares CD133+ de su propia médula ósea en la zona periinfarto. Después de 9 a 16 meses de la cirugía, ninguno de los pacientes había experimentado arritmias ventriculares, todos mostraron notable mejoría en la

capacidad de ejercicio y mejoraron en la clasificación de la New York heart association, además mejoraron la fracción de eyección de 37 a 48%.

## V.- PLASTICIDAD

Las células multipotentes existen en diversos tejidos de los adultos, siendo estas, primeramente aisladas de la médula ósea, esta es la fuente más frecuentemente usada para su aislamiento, aunque han sido identificadas también en piel, vasos sanguíneos, músculo y cerebro. De cualquier forma es muy difícil aislar y mantener vivas las células multipotentes fuera del organismo.

El tejido adiposo permite la extracción de volúmenes considerables que implican una alternativa como fuente de células madre. Recientemente se ha reportado que el tejido adiposo contiene una población no caracterizada de células cosechadas por liposucción con capacidad *in vitro* para sufrir diferenciación adipogénica, osteogénica, condrogénica y miogénica. Las células madre multipotentes derivadas de los adipocitos (MADS), han sido aisladas y caracterizadas del tejido adiposo humano, para este efecto se ha utilizado la fracción del estroma vascular del tejido adiposo blanco proveniente de donadores jóvenes, para prevenir los efectos potenciales de la edad que pudieran presentarse sobre las propiedades de estas. En fases tempranas del cultivo, las células exhibieron una morfología similar a fibroblastos y presentaron un tiempo de duplicación de 36 horas. Sin embargo, después de 60 a 80 replicaciones se observaron considerables cambios, tales como mayor tiempo de duplicación de alrededor de 72 horas y laxitud celular seguida de actividad de  $\beta$ -galactosidasa asociada a la senescencia celular. Usando técnicas especiales, las MADS presentaron capacidad de autorrenovación *in vitro*, exhibiendo un cariotipo diploide normal y manteniendo la capacidad para diferenciarse en diversos tipos de células mesenquimales.

Las células madre hematopoyéticas de médula ósea y de sangre periférica son capaces de contribuir a la angiogénesis, de tal forma que las células CD34<sup>+</sup> no solo contienen progenitores hematopoyéticos, sino también células, progenitoras endoteliales. Incluso se acepta que existe un progenitor común endotelial y hematopoyético, el hemangioblasto<sup>2</sup>

## VI.- INDUCCION DE LA DIFERENCIACION CON CITOCINAS Y USOS TERAPEUTICOS DE LAS CELULAS CD 133

El uso actual que se da a las células CD133 es de suma importancia, ya que debido a su capacidad de autorrenovación y diferenciación en células de distintas clases de tejidos, como el cardiaco, células neurales, hueso, células hematopoyéticas, han sido utilizadas con mayor frecuencia para el tratamiento de infartos, enfermedades neurológicas como Alzheimer, enfermedad de Parkinson, diabetes<sup>3</sup>, enfermedades hematológicas, teniendo un amplio horizonte de investigación en el posible uso terapéutico. La utilidad de las células madre humanas va desde la terapia génica, para la corrección de desordenes genéticos a la propagación *in vitro* y posterior trasplante para propósitos de recuperación hematológica e injerto a largo plazo en pacientes bajo terapias agresivas contra cáncer<sup>11</sup>.

Los anticuerpos CD 133 serán usados para seleccionar células madre y progenitoras hematopoyéticas para estudios de trasplantes como una alternativa a las más frecuentemente usadas CD34<sup>+</sup>.

El grupo de Orlic y Anversa han demostrado, en un modelo de infarto de miocardio murino, que una inyección de células de médula ósea Lin- y c-kit+ (fenotipo de marcadores de superficie típico de células madre hematopoyéticas) en el corazón dañado, resulta en la colonización de estas en más de la mitad del área infartada. La contribución de las células madre adultas a la regeneración cardiaca ha sido sugerida por estudios realizados en modelos de trasplante cardiaco en humanos: en un grupo de pacientes varones transplantados con corazones de donantes femeninos, el análisis de biopsias cardiacas permitió identificar que un porcentaje entre el 7-10% de los cardiomiocitos provenían del propio receptor, ya que en ellos se podía identificar el cromosoma Y<sup>3</sup>.

Ante un daño tisular, por ejemplo, un infarto agudo del miocardio se ha observado que ocurre un aumento de células madre en la zona lesionada, cuyo pico se presenta al séptimo día y que cubre tres eventos:

- a) Movilización de las células madre de la médula ósea
- b) Anidamiento en el sitio dañado
- c) Diferenciación en las células del tejido lesionado

Por lo anterior, cada uno de estos pasos significa una herramienta terapéutica potencial.

Aunque no se conocen del todo los factores que inducen a que las células madre se movilicen y aniden en el tejido dañado, entre los más estudiados hasta el momento se encuentran el factor de células madre c-kit, el receptor de la quimiocina CXCR4, el factor derivado de las células mesenquimatosas, el factor estimulante de colonias granulocitos y el factor de crecimiento endotelial vascular, entre otros<sup>3</sup>.

La administración de células madre puede realizarse por varios métodos a saber:

- 1) Inyección intramiocárdica
- 2) Inyección transendocárdica
- 3) Inyección intracoronaria
- 4) Endovenosa
- 5) En el seno coronario

Es de hacer notar que los experimentos en humanos es limitada y aún no se tiene un protocolo adecuado en el caso de IAM.

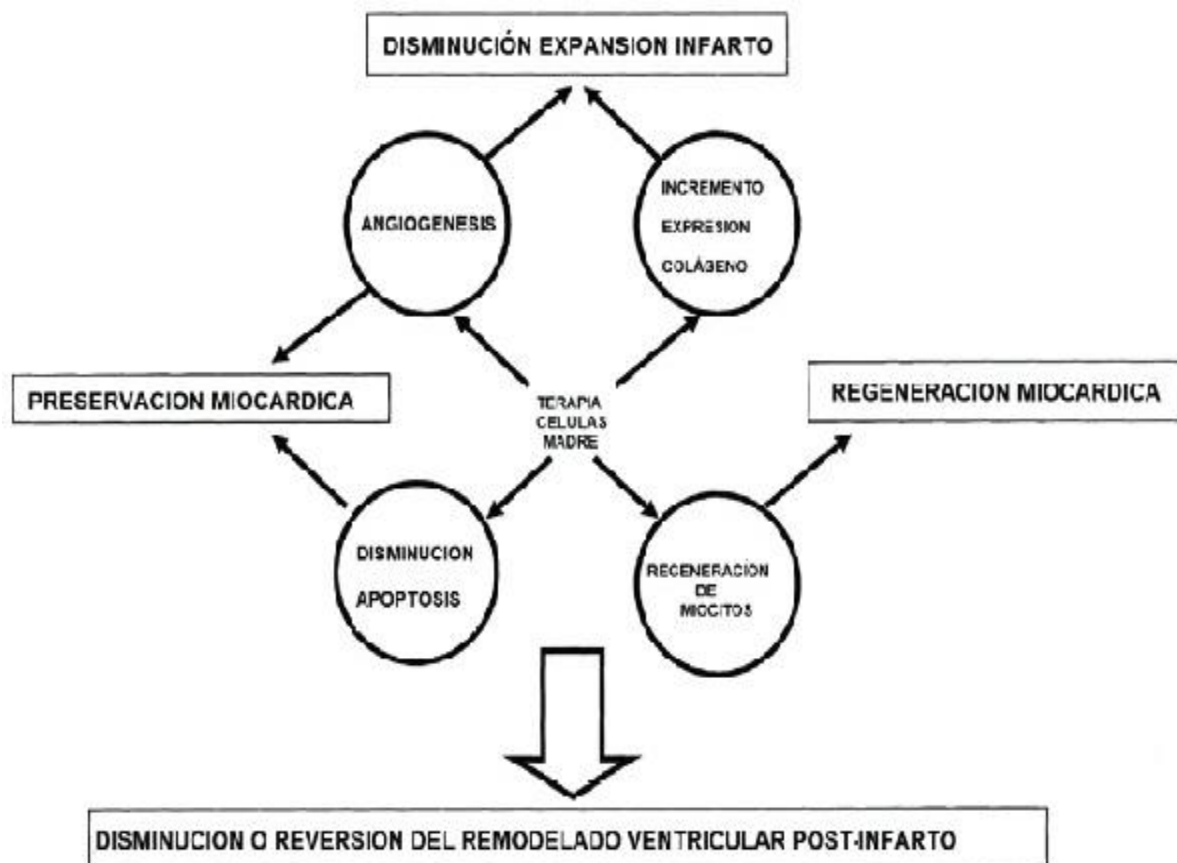


Figura 5. Mecanismos potencialmente beneficiosos del tratamiento con células madre<sup>3</sup>.

Basándose en que las células madre hepáticas expresan marcadores de superficie asociados a células madre hematopoyéticas (c-kit, flt-3, Thy-1 y CD34+), se ha sugerido que estas podrían diferenciarse en células ovas y hepatocitos. El grupo de Lagasse ha demostrado que las células madre hematopoyéticas de médula ósea con fenotipo Lin-, c-kit+, Thy-1, Sca-1 son capaces de regenerar el hígado murino en un modelo de daño hepático fulminante, mientras que utilizando modelos de quimerismo en pacientes sometidos a trasplantes de médula ósea o de hígado, y aprovechando la posibilidad de utilizar el cromosoma Y como marcador del origen de la célula, también se ha podido demostrar que un porcentaje de hepatocitos provienen de células madre de origen no hepático.<sup>2</sup>

Otra de las enfermedades sobre las que el trasplante de células madre ha generado importantes expectativas es la diabetes mellitus. Esta se divide en dos ramas, la diabetes mellitus tipo 1 (insulino dependiente) o DM1, caracterizada por un proceso autoinmune de destrucción de las células productoras de insulina que provoca la falta de esta hormona; y la diabetes mellitus tipo 2 (no insulino

dependiente), que representa un 90% de los casos diagnosticados. Su aparición se debe a la combinación entre la resistencia a la acción de la insulina por parte de los tejidos periféricos, y a una alteración en la función de la célula pancreática. Esta disfunción parece ser el resultado de la incapacidad de las células  $\beta$  para producir y secretar insulina cuando aumenta la demanda de esta. La diabetes afecta a un 4-5% de la población mundial. A diferencia de las células que provienen del mesodermo (cardiomiocitos) o las que provienen del ectodermo (células neuronales), las células derivadas del endodermo pueden ser diferenciadas espontáneamente *in vitro* entre las que se incluyen las células pancreáticas, las cuales requieren la presencia de factores en general desconocidos hasta hoy, que son los que dirigen la diferenciación celular. Entre los diversos estudios realizados, destacan los del Dr. Soria en el 2001 quien implantó agregados de células de páncreas, diferenciadas *in vitro*, en ratones con diabetes mellitus, los cuales presentaron en su mayoría un control de la glucosa, sin embargo, el 40% de los transplantados desarrollaron a las doce semanas, nuevamente hiperglicemia<sup>4</sup>.

## VII.- CONCLUSIONES:

- La utilización de células madre en el futuro despierta enormes expectativas entre las cuales destacan la terapia regenerativa de enfermedades hasta ahora incurables como el síndrome de Parkinson, distrofias musculares, diabetes y enfermedades cardíacas o como vehículo de terapia génica.
- El estudio de las células madre plantea un amplio campo de investigación sin embargo, hacen falta muchos más estudios para que en el futuro, la terapia celular sea utilizada con eficacia y sea posible sus uso en infinidad de padecimientos en los que el tejido original ha sido dañado o por alguna circunstancia ha dejado de cumplir con sus funciones normales.
- Hasta ahora la utilización de células tallo se ha enfocado más al tratamiento de las enfermedades hematológicas, tales como leucemias o aplasias en las que las células utilizadas, provienen en su totalidad de un donante y no se utilizan aún células cultivadas o de propagación celular.



## BIBLIOGRAFIA

- 1.- Sheri J. Miraglia, David Buck Reviewer: Hans-Joerg Buehring AC133(CD133) PROW 2:4-8(2001)
- 2.- F. Prósper, Clínica universitaria, Universidad de Navarra C.M. Verfaillie Adult Stem Cells, Institute University of Minnesota. An. Sist. Sanit. Navar. 2003, vol 26, num. 3, pp.345-356
- 3.- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B et al. Bone Marrow Cells regenerate infarcted myocardium. Nature 2001, vol 410 pp 701-705.
- 4.- Soria B, Skoudy A, Martin F, From Stem Cells to Beta Cells, New strategies in Cell Therapy of Diabetes Mellitus. Diabetología 2001, vol. 44, num. 4, pp. 407-415
- 5.- Flores Figueroa Eugenia, Montesinos Juan José, Mayani Héctor 2006 Células troncales Mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica Revista de Investigación Clínica Vol. 58 Num.5 pp. 498-511
- 6.- Tomás Martínez J. Francisco, Fernandez-Rañada de la Gándara José Ma. Capítulo 38 Transplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas en Medicina Transfusional Radillo González A. Segunda edición Editorial Prado 2007 pp. 687-705
- 7.- Joyce S.G. Yeoh, Ronald Van Os, Ellen Weersing, Albertina Ausema, Bert Dontje, Edo Vellenga, Gerald de Haan. 2006 Fibroblast growth factor-1 and -2 Preserve long term repopulating Ability of hematopoietic Stem Cells in Serum-Free Cultures Stem Cells vol 24 num 6 pp. 1564-1572.
- 8.- Forrester James S., Price Mathew J. and Makkar Raj R. 2003 Stem Cell repair of Infarcted Myocardium: An Overview for Clinicians Circulation 2003; vol 108; pp. 1139-1145
- 9.- Tomas Graf 2002 Differentiation plasticity of hematopoietic cells Blood 2002 vol. 99 pp. 3089-3101

10.- Fukuchi Yumi, Nakajima Hideaki, Sugiyama Daisuke, Hirose Imiko, Kitamura Toshio, Tsuji Kohichiro. 2004. Human Placenta-derived Cells Have Mesenchymal Stem/Progenitor Cell Potential. Division of Cellular Therapy, The Advanced Clinical Research Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo Japan  
Stem Cells 2004 vol. 22, pp. 649-658.

11.- Gallacher Lisa, Murdoch Barbara, Dongmei M. Wu, Karanu Francis N., Keeney Mike, and Bhatia Mickie. 2000 Isolation and characterization of Human CD34<sup>-</sup>LIN<sup>-</sup> AND CD34<sup>+</sup>LIN<sup>-</sup> Hematopoietic Stem Cells Using Cell Surface Markers AC 133 and CD7 Blood, 2000, Vol 95 No.9 pp.2813-2820

12.- J.Sans Sabafren. Capítulo 1: Hematopoyesis en Hematología Clínica. J.Sans Sabafren 2a. Edición Editorial Doyma Barcelona España pp 50-88.

13.- Apéndice II Características principales de las moléculas CD Inmunología Celular y Molecular K. Abbas Abul, H. Lichtman Andrew Quinta edición 2004, Editorial Elsevier Madrid España.Pag 506-521

14.- Weissman Irving L. 2000 Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration and Units in Evolution Cell, vol. 100 pp. 157-168

15.- Sheri Miraglia, Wayne Godfrey, Amy H. Yin, Kristin Atkins, Roger Warnke, Jeannine T. Holden, Robert A. Bray, Edmund K. Waller and David W. Buck A Novel Five-Transmembrane Hematopoietic Stem Cell Antigen: Isolation, Characterization, and Molecular Cloning 1997 vol 90: pp. 5013-5021