

Biología de las células madre embrionarias (ES cells) en distintas especies: potenciales aplicaciones en biomedicina[#]

Biology of embryonic stem cells (ES cells) in different species: potential applications in biomedicine

ME Arias, R Felmer*

Laboratorio de Biotecnología Animal, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-Carillanca, Temuco, Chile.

SUMMARY

Embryonic stem cells (ES cells) are undifferentiated cells that derive from the inner cellular mass (ICM) of blastocyst-stage embryos. These cells can grow indefinitely *in vitro* preserving the ability to differentiate into all cell types of an individual. ES cells have become a powerful tool to study the early embryonic development, in functional genomics, to generate gene targeted transgenic animals and recently in animal cloning and medicine. Furthermore, current research developed on their biological properties and possible applications in regenerative medicine, due to their enormous potential of repair, are opening great possibilities that will allow to design, in the near future, revolutionary therapies to diverse human diseases nowadays incurable. In this review the general aspects of the isolation, derivation, culture, differentiation and transformation of these cells in different animal species are described as well as their promising applications in biomedicine.

Palabras clave: células madre embrionarias, clonación, terapia de reemplazo celular.

Key words: embryonic stem cells, cloning, cell replacement therapy.

INTRODUCCIÓN

Las células madre son células indiferenciadas, inmaduras, autorrenovables y capaces de generar uno o más tipos de células diferenciadas. En las condiciones adecuadas, estas células pueden dividirse indefinidamente conservando siempre una población estable de células madre, que bajo las condiciones apropiadas y recibiendo los estímulos adecuados pueden diferenciarse hacia diferentes tipos de células especializadas de un organismo adulto (Evans y Kaufman 1981, Das y col 2008). Dependiendo de la etapa de desarrollo, es posible diferenciar cuatro tipos de células madre: i) las células madre embrionarias totipotenciales, ii) las células madre embrionarias pluripotenciales, iii) las células madre multipotenciales y iv) las células madre progenitoras unipotenciales. La célula madre por excelencia y que ocupa el primer nivel corresponde al óvulo fecundado o cigoto, el cual es totipotente ya que puede generar todas las células que darán lugar al organismo adulto, incluidas las células somáticas, germinales y extraembrionarias (Gjorret y Maddox-Hyttel 2005).

Las células del segundo nivel corresponden a las células madre embrionarias (ES cells, del inglés *Embryonic*

Stem Cells) que son las células en las que se enfocará esta revisión. Estas células derivan de la masa celular interna (ICM, del inglés *Inner Cell Mass*) de un embrión al estado de blastocisto, esto es, dependiendo de la especie, 4-7 días después de la fecundación (figura 1). Esta estructura particular surge como resultado de una serie de divisiones sucesivas de las células embrionarias (o blastómeras), las cuales se especializan para conformar una estructura hueca constituida por una capa externa de células denominada trofoectodermo (TE), e interiormente por células en forma de racimo (el ICM). La capa externa de células continúa su desarrollo para formar la placenta y otros tejidos necesarios para la implantación y posterior desarrollo fetal del embrión en el útero, mientras que las células internas se desarrollan y especializan en los tejidos de las diferentes capas germinales del embrión, endodermo, mesodermo y ectodermo, formando así todos los tejidos de un organismo (Hooper 1992). Las células madre embrionarias se les denomina entonces pluripotentes, ya que pueden generar todos los tipos celulares del cuerpo, pero no pueden dar origen a las células de la placenta. De esta forma, los embriones preimplantacionales constituyen el material de partida de elección para el aislamiento de las células madre embrionarias, convirtiéndose en el principal foco de controversia para la aplicación de esta tecnología en humanos, ya que para su derivación se hace necesaria la destrucción del embrión.

Existen otras dos fuentes a partir de las cuales es posible aislar células madre embrionarias: i) las germinales (EGC, del inglés *Embryonic Germ Cells*), las cuales se desarrollan en los tejidos gonadales del embrión o feto

Accepted: 21.01.2009.

Financiado en parte por proyecto FONDECYT 1080216

* Laboratorio de Biotecnología Animal, Instituto de Investigaciones Agropecuarias, INIA-Carillanca. Camino Cajón Vilcún s/n, km 10, Casilla 58-D, Temuco, Chile; rfelmer@inia.cl

y que dan lugar posteriormente a los gametos (figura 1) (Shamblott y col 2001) y ii) las de carcinoma (ECC, del inglés *Embryonic Carcinoma Cells*), las cuales provienen de tumores complejos denominados teratocarcinomas, que derivan de gónadas adultas (figura 1) (Skakkebaek y col 1987). Estas tres fuentes de células madre embrionarias tienen la capacidad de diferenciarse *in vitro*, contribuyendo a la línea germinal luego de su inyección en blastocistos en desarrollo. No obstante, dada la naturaleza tumoral y cariotipo anormal de las células embrionarias de carcinoma, la mayor parte de las investigaciones con células madre embrionarias se han realizado a partir de las células derivadas de la masa celular interna.

A partir del aislamiento de las primeras líneas de células madre embrionarias en ratón (Evans y Kaufman 1981, Martin 1981), este tipo de células han sido investigadas intensamente ya que poseen dos características que las convierten en únicas en relación a otras células madre específicas de órganos identificadas hasta la fecha. La primera es la capacidad de autorrenovación *in vitro*, es decir, pueden mantenerse en cultivo luego de numerosos pasajes y durante períodos prolongados (quizás indefinidamente) como una población homogénea de células indiferenciadas, conservando un cariotipo normal. La segunda característica es la pluripotencialidad, pudiendo originar, bajo estímulos adecuados, cada célula de un individuo. Esta capacidad quedó en evidencia cuando Bradley y col (1984) inyectaron células madre embrionarias de ratón en blastocistos en desarrollo, observando más tarde la contribución de estas células a todos los tejidos de los ratones quimeras adultos generados, incluyendo la línea germinal.

En el tercer nivel se encuentran las células madre adultas (SC, del inglés *Stem Cells*) que son células multipotenciales, ya que poseen una capacidad limitada para diferenciarse, dando origen sólo a las células de un órgano concreto en el embrión y/o en el adulto (figura 1). El ejemplo más clásico de estas células son las células madre de la médula ósea, las cuales pueden generar los tipos celulares de la sangre y del sistema inmune (Lovell-Badge 2001) y las células madre de la placenta y/o cordón umbilical, que se extraen al momento del parto y que en Chile han adquirido gran relevancia luego de la reciente creación del primer banco público de células madre¹, en el cual se criopreservan estas células por tiempo indefinido para futuros tratamientos de enfermedades, sobre todo del tipo hematológico como leucemias, anemias y linfomas.

Finalmente en el cuarto nivel se encuentran células con limitada capacidad proliferativa y más bien una tendencia a la unipotencialidad, es decir, que pueden originar solamente células terminales. Algunos ejemplos de estas células son las células progenitoras eritroides o las células progenitoras neuronales, las cuales se diferencian exclusivamente en eritrocitos y neuronas, respectivamente. De esta forma, dependiendo del potencial de la célula madre, ésta puede

clasificarse en totipotente si es capaz de generar todas las células del embrión y del tejido extraembrionario, pluripotente si puede crear todos los tipos celulares que formarán el embrión, multipotente si sólo es capaz de generar los tipos celulares del tejido de donde proviene, o unipotente si da lugar a un único tipo celular (Temple 2001).

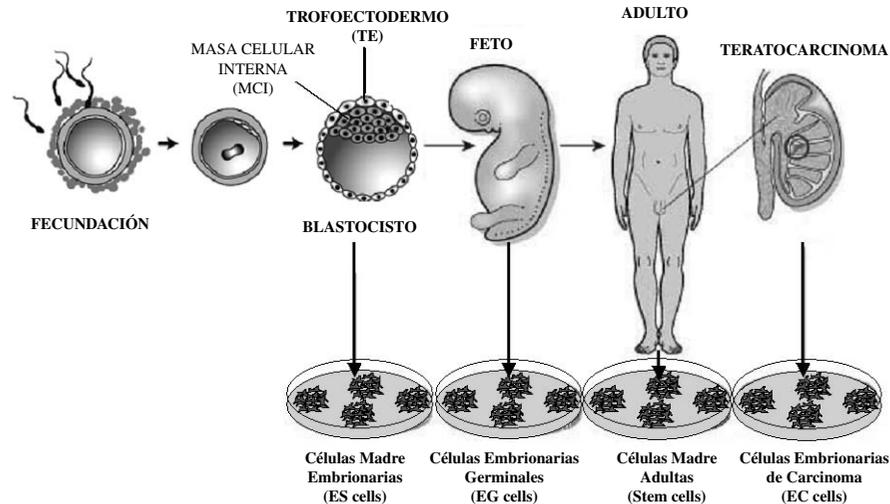
DERIVACIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS EN DIFERENTES ESPECIES

Las células madre embrionarias fueron aisladas por primera vez desde la masa celular interna de blastocistos de ratón en 1981 (Evans y Kaufman 1981, Martin 1981). Estos estudios preliminares fueron la base para que años más tarde se hayan logrado establecer líneas de células madre embrionarias a partir de otras especies como el hámster (Doetschman y col 1988), cerdo (Evans y col 1990, Vackoba y col 2007), bisonte (Sukoyan y col 1993), macaco de la India (Thomson y col 1995), marmota (Thomson y col 1996), pollo (Pain y col 1996), bovino (Stice y col 1996, Cibelli y col 1998, Wang y col 2005), humano (Thomson y col 1998), perro (Hayes y col 2008) y gato (Yu y col 2008). Más recientemente, en pocas especies se han aislado líneas de células madre embrionarias a partir de embriones clonados, generados por fecundación *in vitro* y/o partenogénesis (Wakayama y col 2001, Cibelli y col 2002, Wang y col 2005, Byrne y col 2007, Mai y col 2007).

En un principio, las células madre embrionarias de ratón fueron derivadas y mantenidas en cocultivo con células embrionarias de la misma especie denominadas células alimentadoras, las cuales aportaban los factores de crecimiento necesarios para que estas células crezcan adecuadamente, mantengan un cariotipo normal y preserven su capacidad de autorrenovación y pluripotencia (Evans y Kaufman 1981, Martin 1981). Estudios posteriores identificaron una citoquina derivada de estas células, el factor inhibidor de la leucemia (LIF, del inglés *Leukemia Inhibiting Factor*), como una de las moléculas claves en prevenir su diferenciación y en mantener su capacidad de autorrenovación (Smith y col 1988, Niwa y col 1998, Matsuda y col 1999). Este factor es producido por células de diferentes especies incluyendo líneas celulares de fibroblastos de ratón (STO *Mouse Fibroblast Cell Line*), células de hígado de ratas búfalo (BRL, del inglés *Buffalo Rat Liver*), células Vero y fibroblastos embrionarios humanos (Smith y col 1988, Pease y col 1990, Talbot y col 1995). De esta forma, para el cultivo de las células madre embrionarias de ratón se puede utilizar LIF producido por las células STO, al igual que medio condicionado BRL combinado con células alimentadoras y/o medios libre de células empleando LIF recombinante en combinación con suero bovino fetal (Smith y col 1988, Williams y col 1988).

En el humano, recientemente se han derivado células madre embrionarias, células embrionarias de carcinoma y células embrionarias germinales. Sin embargo, sólo las

¹ <http://www.sochigen.cl/noticias-30-05-2007.htm>



Modificada de Donovan y Gearhar, 2001.

Figura 1. Origen de los diferentes tipos de células madre disponibles. Derivación de células madre embrionarias (ES cells), células madre de carcinoma (EC cells), células embrionarias germinales (EG cells) y células madre de adulto (Stem cells).

Origin of the different types of stem cells available. Derivation of embryonic stem cells (ES cells), embryonic carcinoma cells (EC cells), embryonic germ cells (EG cells) and adult stem cells (Stem cells).

células madre embrionarias derivadas de embriones producidos por fecundación *in vitro* parecieran mantener la mayoría de las propiedades pluripotenciales establecidas para las células madre embrionarias de ratón (Thomson y col 1998, Reubinoff y col 2000). Estas células humanas son denominadas comúnmente células madre embrionarias humanas, aunque por razones éticas su capacidad para reingresar a la embriogénesis y/o colonizar la línea germinal no ha sido probada, por lo que en rigor se las debería denominar “células humanas parecidas a las células madre embrionarias” (hES like cells). Si bien las condiciones de cultivo para estas células no están bien definidas como para las células madre embrionarias de ratón, los protocolos de cultivo desarrollados en los últimos años han permitido mantener poblaciones o líneas de estas células en cultivo por períodos prolongados, conservando un cariotipo normal y sus características incluyendo su potencial de diferenciación *in vitro* e *in vivo*. Así, actualmente estas células pueden crecer sobre células alimentadoras con medio libre de suero y suplementado con bFGF (del inglés *basic Fibroblast Growth Factor*), también sobre placas revestidas con laminina y medio condicionado por fibroblastos embrionarios de ratón o con medio conteniendo LIF recombinante en la presencia de BMP4 (del inglés *Bone Morphogenic Protein 4*), la cual permite sustituir los requerimientos de suero bovino fetal (Thomson y col 1998, Amit y col 2000, Xu y col 2001, Ying y col 2003).

En el caso de animales domésticos como el bovino, para el aislamiento y cultivo de las células madre embrionarias bovinas, se han utilizado diferentes tipos celulares

como sustrato, incluyendo fibroblastos fetales bovinos (First y col 1994), células epiteliales de útero bovino (van Stekelenburg-Hamers y col 1995), células STO (Talbot y col 1995), fibroblastos epiteliales de ratón (Cibelli y col 1998, Mitalipova y col 2001) y fibroblastos humanos de pulmón (Iwasaki y col 2000). Sin embargo, a pesar de haberse generado hasta la fecha al menos seis líneas de células madre embrionarias en esta especie que exhiben pluripotencia tanto *in vitro* como *in vivo*, todas varían entre sí en morfología y en marcadores genéticos de expresión normalmente asociados a estados de indiferenciación y pluripotencia de estas células en otras especies (Stice y col 1996, Cibelli y col 1998, Kitiyanant y col 2000, Mitalipova y col 2001, Saito y col 2003, Wang y col 2005). Más aún, a pesar de haberse generado quimeras transgénicas, luego de la inyección de estas células modificadas genéticamente en embriones en desarrollo, no se ha demostrado la contribución de estas células a la línea germinal y por lo tanto su transmisión a la descendencia (Niemann y Reichelt 1993, Cibelli y col 1998, Iwasaki y col 2000, Wang y Zhou 2003).

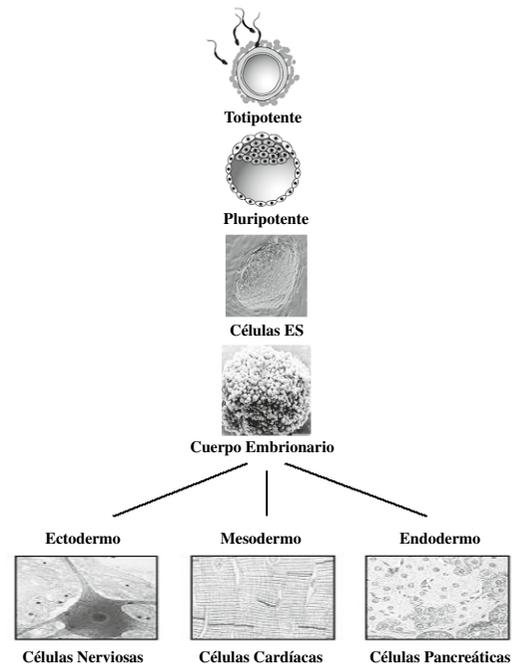
PROPAGACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS *IN VITRO*

En general, las células madre embrionarias se propagan por disociación enzimática de las colonias y sembrando células individuales para la formación de nuevas colonias (Evans y Kaufman 1981, Thomson y col 1995, 1996, Cibelli y col 2002). En el bovino, a diferencia de otras especies, las células madre embrionarias no forman colonias después de

la disociación enzimática y posterior resembrado (Stice y col 1996, Cibelli y col 1998, Mitalipova y col 2001). Además, estas células son sensibles a las enzimas utilizadas para la disociación, incluidas la tripsina empleada para disociar células madre embrionarias de ratón y la colagenasa tipo IV y proteasa E, empleadas para la disociación de células madre embrionarias humanas (Wang y col 2005). Todas estas enzimas intervienen fuertemente en la capacidad de autorrenovación y causan diferenciación espontánea. Sin embargo, recientemente Roach y col (2006) reportaron la generación de células madre embrionarias bovinas que pudieron ser disociadas utilizando una baja concentración de tripsina 0,05%/EDTA. Aunque el método necesita ser optimizado en cada caso, estos investigadores han desarrollado líneas de células madre embrionarias bovinas con morfología similar a las establecidas para células madre embrionarias humanas y de ratón, así como marcadores de expresión idénticos a los que se expresan en embriones bovinos en estado de blastocistos (Roach y col 2006).

DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

El gran objetivo de la tecnología de las células madre embrionarias consiste en dirigir los cultivos de células indiferenciadas hacia la formación de tejidos y órganos para terapias de reemplazo celular (Rippon y Bishop 2004). Las células utilizadas para estos propósitos terapéuticos deben ser seleccionadas por su estabilidad genética y normalidad, antes de iniciar la aplicación terapéutica en humanos. De esta forma, el principal desafío para la aplicación futura de las terapias de sustitución celular es el control sobre la diferenciación de estas células hacia tejidos específicos. Es por tanto necesario desarrollar procedimientos que conduzcan eficazmente a la diferenciación de las células madre embrionarias hacia los tipos específicos de células que se requieran en cada caso. La diferenciación *in vitro* de estas células se realiza removiendo del medio de cultivo los factores que las mantienen indiferenciadas y aplicando los estímulos apropiados necesarios para su diferenciación hacia las tres líneas germinales embrionarias (figura 2) (Keller 1995, Smith 2001). Cuando estas células son cultivadas en suspensión, en ausencia de factores antidiferenciación, forman agregados celulares tridimensionales llamados cuerpos embrionarios (EB, del inglés *Embryo Bodies*) (figura 2), los que luego de 2-4 días en cultivo forman el endodermo, dando lugar a un cuerpo embrionario simple, el cual se diferencia al cuarto día generando una estructura más compleja con epitelio columnar y membrana basal (Leahy y col 1999). En esta etapa, los cuerpos embrionarios son llamados cuerpos embrionarios quísticos (Evans y Kaufman 1981, Keller y col 1993, Ng y col 2005). La continuación en cultivo y la exposición a los estímulos y/o agentes químicos adecuados pueden inducir la diferenciación de estos cuerpos embrionarios hacia un linaje específico, por



Modificado de Wobus y Boheler, 2005

Figura 2. Diferenciación *in vitro* de células ES. Las células madre embrionarias pluripotentes se derivan *in vitro* de la masa celular interna de blastocistos en desarrollo. La prolongación del cultivo de estas células genera estructuras vía formación de agregados tridimensionales denominadas cuerpos embrionarios, los que bajo estímulos adecuados se diferencian en los tipos celulares de las tres capas germinales, mesodermo, ectodermo y endodermo.

In vitro differentiation of EG cells. Pluripotent ES cells are derived *in vitro* from the inner cell mass of developing blastocysts. The continuation of these cells in culture generates tri-dimensional structures denominated embryo bodies, which under appropriate stimuli can differentiate in the cellular types of the 3 germinal layers, mesoderm, ectoderm and endoderm.

ejemplo ácido retinoico para la diferenciación a células neuronales (Ezekiel y col 2007), aFGF (del inglés *acidic Fibroblast Growth Factor*) y HGF (del inglés *Hepatocyte Growth Factor*) para diferenciación en células hepáticas (Hu y col 2003), TSH (del inglés *Thyroid Stimulating Hormone*) para la diferenciación en adipocitos (Lu y Lin 2008) y en conjunto bFGF, IGF-1 (del inglés *Insulin-like Growth Factor-1*) y nicotinamida para su diferenciación en células semejantes a los islotes del páncreas, entre otros (Liu y col 2005, Liersch y col 2006).

Para determinar el potencial de diferenciación *in vivo*, las células madre embrionarias de origen animal se agregan a embriones de ocho células o a embriones en la etapa de blastocisto para originar una quimera en la que posteriormente es necesario establecer la contribución de estas células en la formación de la masa celular interna y del trofoectodermo (Saito y col 2003) y en al menos un porcentaje no inferior al 10% en la formación de algún tejido en los animales nacidos (Stice y col 1996, Cibelli

y col 1998). Como por razones éticas esta evaluación no se puede realizar en humanos, en las células madre embrionarias humanas y también en las de algunos animales, la pluripotencia *in vivo* se confirma por la formación de teratomas, luego de su inyección en ratones con inmunodeficiencia combinada (Stojkovic y col 2004).

MARCADORES DE PLURIPOTENCIA ASOCIADOS A LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Los análisis moleculares han revelado que la citocina LIF actúa a través de la activación del receptor de membrana gp130 del factor de transcripción STAT3 (del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) (Niwa y col 1998, Matsuda y col 1999), mientras que el efecto de BMP4 estaría mediado por la activación del factor de transcripción SMAD (del inglés *Small Mothers Against Decapentaplegic*) y la subsiguiente inducción del factor inhibitorio de la diferenciación (Id, del inglés *Inhibitory Differentiation Factor*) de tipo bHLH (del inglés *basic Helix-Loop-Helix*). Además de STAT3 e Id, otros dos factores de transcripción que han mostrado tener roles fundamentales en la mantención del estado indiferenciado de las células madre embrionarias son Oct-4 (del inglés *Octamer Transcription Factor-4*) (Niwa y col 2000) y Nanog (Chambers y col 2003, Mitsui y col 2003).

Oct-4 es esencial para el desarrollo inicial de la pluripotencialidad en el macizo celular interno de cigotos de ratón y para mantener la pluripotencialidad de las células madre embrionarias, respectivamente. No obstante, análisis cuantitativos revelaron que los niveles altos de expresión de este factor inducen la diferenciación de las células madre embrionarias de ratón hacia líneas del endodermo y mesodermo, mientras que niveles bajos de expresión inducen pérdida de la pluripotencialidad y desdiferenciación hacia células del trofooctodermo (Niwa y col 2000). Por esta razón, se ha postulado a este factor de transcripción como “regulador maestro de la pluripotencialidad”, ejerciendo su efecto mediante la regulación de la expresión de al menos siete genes necesarios para la diferenciación (Pesce y col 1998). En otras especies como cerdos, bovinos y humanos también se ha confirmado la presencia de este factor en el macizo celular interno y en el trofooctodermo (van Eijk y col 1999, Kirchhof y col 2000, Saito y col 2003), llevando a especular una función similar a la de las células madre embrionarias de ratón (Mitalipova y col 2003, Reubinoff y col 2000). De igual forma, se ha identificado a Nanog como otro factor maestro regulador de la pluripotencialidad de las células madre embrionarias (Chambers y col 2003, Mitsui y col 2003). La expresión de este factor se ha observado tanto en células madre embrionarias de ratón como humanas, estando ausente en las células diferenciadas. Sin embargo, Nanog es capaz de mantener la autorrenovación de células madre embrionarias de ratón independientemente de la vía STAT3/LIF asociada al factor de transcripción Oct-4.

Las células madre embrionarias de ratón exhiben además actividad fosfatasa alcalina (Resnick y col 1992) y telomerasa (Armstrong y col 2000), al igual que muchas de las líneas de células madre embrionarias humanas (Smith 2001, Carpenter y col 2003, Ginis y col 2004). No obstante, en células madre embrionarias bovinas esta actividad es muy variable (Talbot y col 1995, Stice y col 1996, Strelchenko 1996, Cibelli y col 1998). Adicionalmente existen antígenos característicos asociados a la pluripotencialidad de las células madre embrionarias denominados marcadores de indiferenciación y/o pluripotencia. Los antígenos embrionarios específicos de SSEA-1 (del inglés *Stage Specific Embryonic Antigen-1*) y SSEA-3 se observan en células madre embrionarias de ratón, mientras que las células madre embrionarias humanas expresan SSEA-3 y SSEA-4 (Carpenter y col 2003). En el caso de las células madre embrionarias bovinas, estudios inmunohistoquímicos revelaron la expresión de SSEA-1 (Saito y col 2003), pero se han obtenido resultados contradictorios con respecto a la expresión de SSEA-3 y SSEA-4 (Mitalipova y col 2001, Saito y col 2003).

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS MEDIANTE RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA DIRIGIDA (GENE TARGETING)

En la década de los ochenta se estableció el gran valor de las células madre embrionarias como herramienta para experimentos de mutagénesis dirigida, al reemplazar o eliminar (*knock-out*) selectivamente un determinado gen en el genoma de un animal. Para llevar esto a cabo, se realiza la modificación genética del gen seleccionado en una copia clonada del mismo, la cual se transfirió posteriormente al genoma de las células mediante recombinación homóloga con una secuencia de ADN similar en el cromosoma. Si estas células se inyectan en embriones de ratón en desarrollo (blastocistos) pueden colonizar el embrión y generar descendencia transgénica, contribuyendo eficientemente hacia la línea germinal de las quimeras resultantes, las que luego de su retrocruzamiento permiten la generación de una línea pura de animales homocigotos para la modificación genética deseada (Gossler y col 1986, Robertson y col 1986).

Los trabajos pioneros de recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón sentaron las bases del primer modelo animal para el síndrome de Lesch-Nyhan, un raro desorden neurológico caracterizado por la deficiencia de la enzima hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT, del inglés *Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase*) (Doetschman y col 1987, Thomas y Capecchi 1987). De esta forma, esta técnica entregó a los investigadores una poderosa herramienta para generar animales transgénicos con mutaciones precisas en su genoma, contándose hasta la fecha con más de 5.000 genes inactivados en el ratón. Estos modelos están siendo utilizados para el estudio

de diversas enfermedades genéticas y para comprender procesos biológicos incluyéndose para el análisis de la función y regulación de genes endógenos (Houdebine 2002). Sin embargo, a pesar de su gran utilidad, estos modelos *knock-out* tienen pocas posibilidades reales para desarrollar tratamientos clínicos o para estudiar los efectos a largo plazo en la salud como resultado de estas modificaciones. La principal restricción del modelamiento de patologías humanas en el ratón están dadas por sus diferencias fisiológicas y reproductivas, incluyendo el número de prole, su menor tamaño y corta vida, lo que ha motivado por años la generación de animales domésticos que puedan constituirse en mejores modelos para ser utilizados para estos propósitos.

A pesar de los esfuerzos, las aplicaciones de esta tecnología en especies domésticas se han visto restringidas debido a que aún no se ha demostrado que las células madre embrionarias generadas en estas especies contribuyan a la línea germinal (Niemann y Reichelt 1993, Cibelli y col 1998, Iwasaki y col 2000, Wang y Zhou 2003). No obstante este desalentador escenario, actualmente la tecnología de transferencia nuclear de células somáticas está abriendo nuevas oportunidades. Mediante el nacimiento de la oveja Dolly (Wilmut y col 1997), esta tecnología demostró no sólo la capacidad de utilizar células somáticas para generar un individuo adulto, sino además la factibilidad de manipular genéticamente estas células para generar animales que además de ser clonados son también transgénicos (Schnieke y col 1998). Este importante hito científico pavimentó el camino para los trabajos pioneros de recombinación homóloga en animales domésticos, permitiendo de esta forma la generación de los primeros modelos de animales domésticos con mutaciones definidas en su genoma. Uno de estos modelos busca prevenir el rechazo hiperagudo que se produce en el trasplante de órganos de cerdo a humanos, que se cree estaría dado por el epítipo α -1,3-galactosa que está presente en las células de cerdo pero no en las células humanas, por lo que su eliminación podría aplacar algunos de los aspectos del estímulo de rechazo (Wang y Zhou 2003). Recientemente se ha logrado la eliminación de este gen en células somáticas, las que fueron posteriormente utilizadas como donantes de núcleo en experimentos de transferencia nuclear, generándose los primeros cerdos *knock-out* para esta mutación, estando a la espera las investigaciones de los tejidos y órganos de estos animales en otros modelos no humanos, que sin duda entregarán valiosa información respecto al mecanismo de rechazo hiperagudo, acercando las posibilidades para la utilización de estos órganos en trasplantes humanos (Dai y col 2002, Phelps y col 2003, Sharma y col 2003).

La encefalopatía espongiforme bovina (EEB), más conocida como enfermedad de las vacas locas, es una enfermedad neurodegenerativa causada por proteínas resistentes a proteasas denominadas priones (PrP, del inglés *Prion Protein*) (van Keulen y col 2008). Debido a que las ovejas y los bovinos poseen genes funcionales de los priones y son

utilizados para generar productos biomédicos, tales como gelatina, colágeno y recientemente proteínas humanas en biorreactores transgénicos, se hace necesario disponer de animales resistentes a los priones. Los primeros modelos de ratones generados donde se eliminó una copia del gen del prion (PrP^{+/-}) no evidenciaron anomalías en su conducta, mientras que los homocigotos nulos (PrP^{-/-}) no desarrollaron las características clínicas y patológicas clásicas del *scrapie* luego de su inoculación con priones de ratón (Bueler y col 1994). Estos hallazgos sugieren que la eliminación de este gen en ovejas y bovinos podría permitir la generación de modelos animales resistentes a la EEB o al *scrapie*. Los primeros experimentos tendientes a demostrar esta hipótesis corresponden a los trabajos recientes de Denning y col (2001) quienes generaron ovejas heterocigotas para este gen, estando a la espera la generación de líneas de animales homocigotos nulos, antes de que se pueda evaluar la sobrevivencia y resistencia de estos animales a la enfermedad.

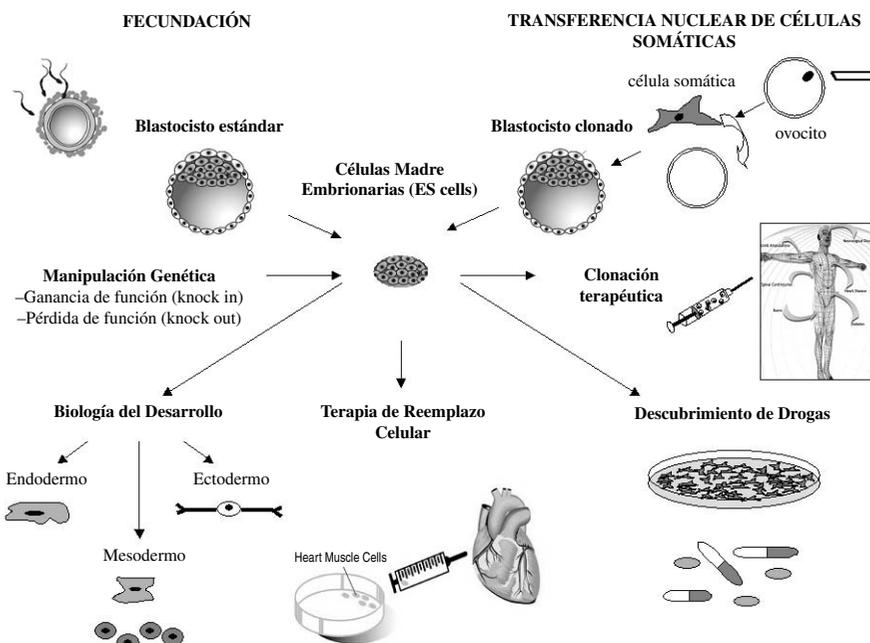
APLICACIONES DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS EN BIOMEDICINA

DESARROLLO DE NUEVAS DROGAS

Se ha sugerido que las células madre embrionarias pueden tener su aplicación en el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas con potencial farmacéutico (figura 3). En efecto, algunos tipos celulares como cardiomiocitos y hepatocitos generados desde células madre embrionarias humanas podrían proporcionar una población ideal de células para evaluar con mayor exactitud la efectividad de un determinado fármaco o su toxicidad (Keller 2005). Este sistema proporcionaría ventajas adicionales ya que las células humanas pueden revelar la toxicidad de ciertas drogas que no necesariamente se detectan en los análisis convencionales, como en los ensayos desarrollados con líneas celulares de ratón o los ensayos llevados a cabo *in vivo* en animales.

TERAPIA DE REEMPLAZO CELULAR

La aplicación de las células madre embrionarias que ha recibido mayor atención en los últimos años es la terapia de reemplazo celular o medicina regenerativa (figura 3), que permitiría el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades debilitantes, tales como diabetes tipo I, enfermedades cardiovasculares, enfermedad de Parkinson y enfermedades de las células sanguíneas (Doss y col 2004). En este caso, lo que se busca es reemplazar células dañadas por células funcionales que restituyan la función normal de los tejidos u órganos de forma más eficiente que a través de terapias convencionales como son los trasplantes, las terapias farmacológicas y/o los tratamientos con proteínas recombinantes. Sin embargo, hasta la fecha el éxito de estas terapias es limitado,



Modificado de Keller, 2005

Figura 3. Usos potenciales de las células madre embrionarias (ES cells) en investigación y medicina. Generación de células madre embrionarias desde blastocistos normales (fecundación) o desde blastocistos clonados (transferencia nuclear de células somáticas).

Potential use of stem cells (EG cells) in research and medicine. Generation of ES cells from normal blastocysts (fertilization) or from blastocyst derived from cloning (somatic cell nuclear transfer).

existiendo varias interrogantes que aún necesitan ser resueltas. Una de ellas es el número de células que deben ser trasplantadas y su estado de diferenciación. Además, en el trasplante con células madre embrionarias existe el riesgo de contaminación con células madre embrionarias residuales no diferenciadas, las cuales se sabe pueden desarrollar teratomas cuando son trasplantadas (Evans y Kaufman 1981, Thomson y col 1998). Esto ha motivado a que actualmente se estén desarrollando técnicas que permitan la purificación de células con un linaje determinado para ser utilizadas con seguridad en los trasplantes (Li y col 1998, Doss y col 2004).

Otro obstáculo a sobreponer es la compatibilidad donante/receptor y el rechazo al trasplante, para lo cual se ha sugerido establecer un banco de muchas líneas de células madre embrionarias que incluirían una proporción significativa de los tipos de histocompatibilidad en la población (Keller 2005). Actualmente existen muchas investigaciones enfocadas a descubrir células progenitoras que sirvan como banco de células para usos terapéuticos, evaluándose varias estrategias que incluyen terapias celulares derivadas de células autólogas, de líneas celulares establecidas desde una variedad de células madre incluyendo la médula ósea, cordón umbilical, células madre embrionarias, así como células de tejidos y órganos de animales genéticamente modificados (Asahara y col 2000, Fodor 2003).

CLONACIÓN TERAPÉUTICA

Para sobreponer el problema habitual del rechazo del injerto por el sistema inmunológico del receptor se han desarrollado numerosas estrategias, la más reciente y conflictiva es quizás la clonación terapéutica, la cual involucra la obtención de células madre embrionarias isogénicas desde embriones clonados, las que pueden ser diferenciadas específicamente en células regenerativas para pacientes que requieren terapia de trasplante celular (Han y col 2007). En la clonación terapéutica los núcleos de células somáticas de un paciente son fusionados con ovocitos enucleados, cultivándolos *in vitro* hasta la etapa de blastocistos y derivando de la masa celular interna líneas de células madre embrionarias isogénicas humanas (figura 3). Sin embargo, las limitaciones de este procedimiento están dadas por la prohibición que existe en muchos países para generar embriones humanos clonados y por la escasez de ovocitos humanos para estos propósitos (Mombaerts 2003).

El apoyo que existe actualmente para generar y utilizar líneas de células madre embrionarias humanas varía entre los diferentes países. En Inglaterra, por ejemplo, la HFEA (The Human Fertilisation and Embryology Authority)²

² www.hfea.gov.uk

aprobó la generación de líneas de células madre embrionarias humanas de embriones sobrantes de procedimientos de fecundación *in vitro*, decisión que también han impulsado España y Suiza. En nuestro país, en cambio, se ha promulgado recientemente la Ley 20.120 (Diario Oficial 22/09/06) en la cual se prohíbe la clonación de seres humanos para cualquier fin y la destrucción de embriones para obtener las células madre embrionarias. En Corea del Sur y otros países asiáticos se aprobó la utilización de embriones humanos clonados para generar líneas de células madre embrionarias (Bavister y col 2005), situación que generó gran conmoción en la comunidad científica mundial, cuando en el año 2004 Woo-Suk Hwang y sus colaboradores anunciaron la obtención de 11 líneas de células madre embrionarias humanas, que provenían de embriones clonados de pacientes con diversas enfermedades inmunológicas congénitas, tales como diabetes tipo I y lesiones en la médula espinal (Hwang y col 2004). Sin embargo, el mismo investigador declaró posteriormente que su trabajo publicado en la revista *Science* había sido un engaño, aunque su laboratorio poseía la tecnología y capacidades para llegar a hacerlo.

Una forma de evitar la utilización de embriones clonados son los resultados promisorios que revelan que ambos gametos, ovocitos y espermatozoides, pueden potencialmente derivarse desde células madre embrionarias crecidas *in vitro* (Hubner y col 2003, Toyooka y col 2003, Geijsen y col 2004). Otra estrategia para generar líneas de células madre embrionarias isogénicas consiste en la fusión de células somáticas con células madre embrionarias, método que ha permitido generar líneas celulares híbridas con cierta conservación de la pluripotencialidad (Tada y col 2001). Más recientemente, investigadores del Instituto Advanced Cell Technology de EE.UU.³ describieron un método alternativo para establecer células madre embrionarias usando una técnica de biopsia de células embrionarias, similar a la utilizada para diagnóstico genético preimplantacional, que no interfiere con el potencial desarrollo del embrión. En este caso, blastómeras individuales fueron extraídas desde un embrión de ratón y/o humano a partir de las cuales se desarrollaron células madre embrionarias que se mantuvieron en cultivo por más de ocho meses, mostrando un cariotipo normal y los marcadores clásicos de pluripotencia, incluyendo Oct-4, SSEA-3, SSEA-4, TRA (del inglés *T cell Receptor Alpha*)-1-60, TRA-1-81, Nanog y fosfatasa alcalina (Chung y col 2006, Klimanskaya y col 2006).

CONCLUSIÓN

La gran variedad de líneas de células madre embrionarias humanas y de otras especies disponibles actualmente ha permitido un mayor conocimiento de la fisiología de estas células incluyendo aspectos claves

de su regulación y diferenciación *in vitro*. A pesar de que actualmente no existen terapias basadas en células madre embrionarias en seres humanos, pues se necesita de más investigaciones y ensayos clínicos antes de que estén disponibles, la gran promesa de estas células reside en la posibilidad de encontrar cura o tratamientos más eficaces a enfermedades crónicas como diabetes, cáncer, Alzheimer, Parkinson y enfermedades cardiovasculares, debido a la capacidad de estas células para crecer indefinidamente y diferenciarse *in vitro* en múltiples tipos celulares y/o tejidos. Sin embargo, no obstante el potencial que encierran estas células, aún persisten grandes desafíos por superar antes de que puedan ser utilizadas efectivamente en terapias celulares, particularmente los motivados por preocupaciones éticas y políticas. Se hace evidente entonces la necesidad de seguir investigando en la derivación y caracterización de estas células en otras especies animales, antes de que podamos ver cumplidas las grandes expectativas que se han generado en torno a sus prometedoras aplicaciones.

RESUMEN

Las células madre embrionarias (ESC del inglés, *Embryonic Stem Cells*) son células indiferenciadas que derivan de la masa celular interna (MCI) de embriones en estado de blastocisto. Estas células se caracterizan por su habilidad para crecer indefinidamente *in vitro* y conservar la capacidad de diferenciarse hacia todos los tipos celulares de un individuo. Las células madre embrionarias se han constituido en una poderosa herramienta para estudios del desarrollo embrionario, genómica funcional, para la generación de animales transgénicos vía recombinación homóloga y más recientemente en clonación y medicina. Debido a su potencial aplicación en la manipulación específica de genes, el aislamiento de estas células en especies domésticas como el cerdo y el bovino podría tener numerosas aplicaciones agropecuarias, farmacéuticas y biomédicas. Más aún, las actuales investigaciones desarrolladas acerca de sus propiedades biológicas y sobre sus posibles aplicaciones en medicina regenerativa, debido al enorme potencial de reparación que encierran, están abriendo grandes posibilidades que permitirán, en un futuro no muy lejano, disponer de revolucionarias terapias para diversas enfermedades humanas que hoy en día son incurables. En esta revisión se describen aspectos generales del aislamiento, derivación, cultivo, transformación y diferenciación de estas células en diferentes especies así como también algunas de sus potenciales aplicaciones en biomedicina.

AGRADECIMIENTOS

La recopilación de material bibliográfico así como también los costos de publicación de este artículo fueron financiados por proyecto FONDECYT 1080216.

REFERENCIAS

- Amit M, MK Carpenter, MS Inokuma, CP Chiu, CP Harris, MA Waknitz, J Itskovitz-Eldor, JA Thomson. 2000. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227, 271-278.
- Armstrong L, M Lako, J Lincoln, PM Cairns, N Hole. 2000. mTert expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells. *Mech Dev* 97, 109-116.

³ <http://www.advancedcell.com/>

- Asahara T, C Kalka, JM Isner. 2000. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther* 7, 451-457.
- Bavister BD, DP Wolf, CA Brenner. 2005. Related challenges of primate embryonic stem cell research. *Cloning Stem Cells* 7, 82-94.
- Bradley A, M Evans, MH Kaufman, E Robertson. 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309, 255-256.
- Bueler H, A Raeber, A Sailer, M Fischer, A Aguzzi, C Weissmann. 1994. High prion and PrPSc levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene. *Mol Med* 1, 19-30.
- Byrne JA, DA Pedersen, LL Clepper, M Nelson, WG Sanger, S Gokhale, DP Wolf, SM Mitalipov. 2007. Producing primate embryonic stem cells by somatic cell nuclear transfer. *Nature* 450, 497-502.
- Carpenter MK, E Rosler, MS Rao. 2003. Characterization and differentiation of human embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 5, 79-88.
- Chambers I, D Colby, M Robertson, J Nichols, S Lee, S Tweedie, A Smith. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643-655.
- Chung Y, I Klimanskaya, S Becker, J Marh, SJ Lu, J Johnson, L Meisner, R Lanza. 2006. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 439, 216-219.
- Cibelli JB, SL Stice, PJ Golueke, JJ Kane, J Jerry, C Blackwell, FA Ponce de Leon, JM Robl. 1998. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol* 16, 642-646.
- Cibelli JB, KA Grant, KB Chapman, K Cunniff, T Worst, HL Green, SJ Walker, PH Gutin, L Vilner, V Tabar, T Dominko, J Kane, PJ Wettstein, RP Lanza, L Studer, KE Vrana, MD West. 2002. Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. *Science* 295, 819.
- Dai Y, TD Vaught, J Boone, SH Chen, CJ Phelps, S Ball, JA Monahan, PM Jobst, KJ McCreath, AE Lamborn, JL Cowell-Lucero, KD Wells, A Colman, IA Polejaeva, DL Ayares. 2002. Targeted disruption of the alpha 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat Biotechnol* 20, 251-255.
- Das S, M Bonaguidi, K Muro, JA Kessler. 2008. Generation of embryonic stem cells: limitations of and alternatives to inner cell mass harvest. *Neurosurg Focus* 24, 1-12.
- Denning C, S Burl, A Ainslie, J Bracken, A Dinnyes, J Fletcher, T King, M Ritchie, WA Ritchie, M 2001. Deletion of the alpha(1,3) galactosyl-transferase (GGTA1) gene and the prion protein (PrP) gene in sheep. *Nat Biotechnol* 19, 559-562.
- Doetschman T, RG Gregg, N Maeda, ML Hooper, DW Melton, S Thompson, O Smithies. 1987. Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells. *Nature* 330, 576-578.
- Doetschman T, P Williams, N Maeda. 1988. Establishment of hamster blastocyst-derived embryonic stem (ES) cells. *Dev Biol* 127, 224-227.
- Donovan PJ, J Gearhart. 2001. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 414, 92-97.
- Doss MX, CI Koehler, C Gissel, J Hescheler, A Sachinidis. 2004. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. *J Cell Mol Med* 8, 465-473.
- Evans MJ, M Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Evans MJ, E Notarianni, S Laurie, RM Moor. 1990. Derivation and preliminary characterization of pluripotent cell lines from porcine and bovine blastocysts. *Theriogenology* 33, 125-128.
- Ezekiel U, M Muthuchamy, J Ryerse, R Heuertz. 2007. Single embryoid body formation in a multi-well plate. *Electron J Biotechnol* 10, 328-335.
- First NL, MM Sims, SP Park, MJ Kent-First. 1994. Systems for production of calves from cultured bovine embryonic cells. *Reprod Fertil Dev* 6, 553-562.
- Fodor WL. 2003. Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol* 13, 102-107.
- Geijsen N, M Horoschak, K Kim, J Gribnau, K Eggan, GQ Daley. 2004. Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 427, 148-154.
- Ginis I, Y Luo, T Miura, S Thies, R Brandenberger, S Gerech-Nir, M Amit, A Hoke, MK Carpenter, J Itskovitz-Eldor, MS Rao. 2004. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* 269, 360-380.
- Gjorret JO, P Maddox-Hyttel. 2005. Attempts towards derivation and establishment of bovine embryonic stem cell-like cultures. *Reprod Fertil Dev* 17, 113-124.
- Gossler A, T Doetschman, R Korn, E Serfling, R Kemler. 1986. Transgenesis by means of blastocyst-derived embryonic stem cell lines. *Proc Natl Acad Sci* 83, 9065-9069.
- Han Z, CA Vandervoort, KE Latham. 2007. Therapeutic cloning: status and prospects. *Curr Opin Mol Ther* 9, 392-397.
- Hayes B, SR Fagerlie, A Ramakrishnan, S Baran, M Harkey, L Graf, M Bar, A Bendoraite, M Tewari, B Torok-Storb. 2008. Derivation, characterization, and *in vitro* differentiation of canine embryonic stem cells. *Stem Cells* 2, 465-473.
- Hooper M. 1992. *Embryonal stem cells: introducing planned changes into the germline*. Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.
- Houdebine LM. 2002. The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. *J Biotechnol* 98, 145-160.
- Hu A, J Cai, Q Zheng, X He, Y Pan, L Li. 2003. Hepatic differentiation from embryonic stem cells *in vitro*. *Chin Med J (Engl)* 116, 1893-1897.
- Hubner K, G Fuhrmann, LK Christenson, J Kehler, R Reinbold, R De La Fuente, J Wood, JF Strauss, M Boiani, HR Scholer. 2003. Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300, 1251-1256.
- Hwang WS, YJ Ryu, JH Park, ES Park, EG Lee, JM Koo, HY Jeon, BC Lee, SK Kang, SJ Kim, C Ahn, JH Hwang, KY Park, JB Cibelli, SY Moon. 2004. Evidence of a pluripotent human embryonic stem cell line derived from a cloned blastocyst. *Science* 303, 1669-1674.
- Iwasaki S, KH Campbell, C Galli, K Akiyama. 2000. Production of live calves derived from embryonic stem-like cells aggregated with tetraploid embryos. *Biol Reprod* 62, 470-475.
- Keller G, M Kennedy, T Papayannopoulou, M Wiles. 1993. Hematopoietic commitment during embryonic stem cell differentiation in culture. *Mol Cell Biol* 13, 473-486.
- Keller G. 1995. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells. *Cell Biol* 7, 862-869.
- Keller G. 2005. Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes & Dev* 19, 1129-1155.
- Kirchhof N, JW Carnwath, E Lemme, K Anastassiadis, H Scholer, H Niemann. 2000. Expression pattern of Oct-4 in preimplantation embryos of different species. *Biol Reprod* 63, 1698-1705.
- Kitiyanant Y, J Saikhun, J Guocheng, K Pavasuthipaisit. 2000. Establishment and long-term maintenance of bovine embryonic stem cell lines using mouse and bovine mixed feeder cells and their survival after cryopreservation. *Science Asia* 26, 81-86.
- Klimanskaya I, Y Chung, S Becker, SJ Lu, R Lanza. 2006. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444, 481-485.
- Leahy A, J Xiong, F Kuhnert, H Stuhlmann. 1999. Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool* 284, 67-81.
- Li M, L Pevny, R Lovell-Badge, A Smith. 1998. Generation of purified neural precursors from embryonic stem cells by lineage selection. *Curr Biol* 8, 971-974.
- Liersch R, F Nay, L Lu, M Detmar. 2006. Induction of lymphatic endothelial cell differentiation in embryoid bodies. *Blood* 107, 1214-1216.
- Liu ML, Y Xiong, JY Cai, YL Pan, FY Meng, LS Li. 2005. Directed differentiation of Balb/C mouse embryonic stem cells into pancreatic islet-like cell clusters *in vitro*: observation by atomic force microscope. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 25, 377-379.
- Lovell-Badge R. 2001. The future for stem cell research. *Nature* 414, 88-91.

- Mai Q, Y Yu, T Li, L Wang, MJ Chen, SZ Huang, C Zhou, Q Zhou. 2007. Derivation of human embryonic stem cell lines from parthenogenetic blastocysts. *Cell Res* 12, 1008-1019.
- Martin GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 78, 7634-7638.
- Matsuda T, T Nakamura, K Nakao, T Arai, M Katsuki, T Heike, T Yokota. 1999. STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J* 18, 4261-4269.
- Mitalipova SM, KD Nusser, DP Wolf. 2001. Parthenogenetic activation of rhesus monkey oocytes and reconstructed embryos. *Biol Reprod* 65, 253-259.
- Mitalipova SM, HC Kuo, JD Hennebold, DP Wolf. 2003. Oct-4 expression in pluripotent cells of the Rhesus monkey. *Biol Reprod* 69, 1785-1792.
- Mitsui K, Y Tokuzawa, H Itoh, K Segawa, M Murakami, K Takahashi, M Maruyama, M Maeda, S Yamanaka. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113, 631-642.
- Mombaerts P. 2003. Therapeutic cloning in the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1, 11924-11925.
- Niemann H, B Reichelt. 1993. Manipulating early pig embryos. *J Reprod Fertil Suppl* 48, 75-94.
- Niwa H, T Burdon, I Chambers, A Smith. 1998. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Gene Dev* 12, 2048-2060.
- Niwa H, J Miyazaki, AG Smith. 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24, 372-376.
- Ng S, R Davis, L Azzola, E Stanley, A Elefanty. 2005. Forced aggregation of defined numbers of human embryonic stem cells into embryoid bodies fosters robust, reproducible hematopoietic differentiation. *Commentary Blood* 106, 1601-1603.
- Pain B, ME Clark, M Shen, H Nakazawa, M Sakurai, J Samarut, RJ Etches. 1996. Long-term *in vitro* culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122, 2339-2348.
- Pease S, P Braghetta, D Gearing, D Grail. 1990. Isolation of embryonic stem (ES) cell in supplemented with recombinant leukemia inhibitory (LIF). *Dev Biol* 14, 344-352.
- Pesce M, MK Gross, HR Scholer. 1998. In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *Bioessays* 20, 722-732.
- Phelps CJ, C Koike, TD Vaught, J Boone, KD Wells, SH Chen, S Ball, SM Specht, IA Polejaeva, JA Monahan, PM Jobst, SB Sharma, AE Lamborn, AS Garst, M Moore, AJ Demetris, WA Rudert, R Bottino, S Bertera, M Trucco, TE Starzl, Y Dai, DL Ayares. 2003. Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science* 299, 411-414.
- Reubinoff BE, MF Pera, CY Fong, A Trounson, A Bongso. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: Somatic differentiation *in vitro*. *Nat Biotechnol* 18, 399-404.
- Resnick JL, LS Bixler, L Cheng, PJ Donovan. 1992. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature* 359, 550-551.
- Rippon HJ, AE Bishop. 2004. Embryonic stem cells. *Cell Prolif* 37, 23-34.
- Roach M, L Wang, X Yang, XC Tian. 2006. Bovine embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 418, 21-37.
- Robertson E, A Bradley, M Kuehn, M Evans. 1986. Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotent cells by retroviral vector. *Nature* 323, 445-448.
- Saito S, K Sawai, H Ugai, S Moriyasu, A Minamihashi, Y Yamamoto, H Hirayama, S Kageyama, J Pan, T Murata, Y Kobayashi, Y Obata, KK Yokoyama. 2003. Generation of cloned calves and transgenic chimeric embryos from bovine embryonic stem-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 309, 104-113.
- Shamblott MJ, J Axelman, JW Littlefield, PD Blumenthal, GR Huggins, Y Cui, L Cheng, JD Gearhart. 2001. Human embryonic germ cell derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 113-118.
- Sharma A, B Naziruddin, C Cui, MJ Martin, H Xu, H Wan, Y Lei, C Harrison, J Yin, J Okabe, C Mathews, A Stark, CS Adams, J Houtz, BS Wiseman, GW Byrne, JS Logan. 2003. Pig cells that lack the gene for alpha1-3 galactosyltransferase express low levels of the gal antigen. *Transplantation* 75, 430-436.
- Skakkebaek NE, JG Berthelsen, A Giwercman, J Muller. 1987. Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl* 10, 19-28.
- Smith AG, JK Heath, DD Donaldson, GG Wong, J Moreau, M Stahl, D Rogers. 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-690.
- Smith AG. 2001. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 435-462.
- Stice SL, NS Strelchenko, CL Keefer, L Matthews. 1996. Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biol Reprod* 54, 100-110.
- Stojkovic M, M Lako, P Stojkovic, R Stewart, S Przyborski, L Armstrong, J Evans, M Herbert, L Hyslop, S Ahmad, A Murdoch, T Strachan. 2004. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step *in vitro* culture. *Stem Cells* 22, 790-797.
- Strelchenko N. 1996. Bovine Pluripotent stem cell. *Theriogenology* 45, 131-140.
- Sukoyan MA, SY Vatolin, AN Golubitsa, AI Zhelezova, LA Semenova, OL Serov. 1993. Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. *Mol Reprod Dev* 36, 148-158.
- Tada M, Y Takahama, K Abe, N Nakatsuji, T Tada. 2001. Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells. *Curr Biol* 11, 1553-1158.
- Talbot NC, AM Powell, CE Rexroad. 1995. *In vitro* pluripotency of epiblasts derived from bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 42, 35-52.
- Temple S. 2001. The development of neural stem cells. *Nature* 414, 112-117.
- Thomas KR, MR Capecchi. 1987. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 51, 503-512.
- Thomson JA, J Kalishman, TG Golos, M Durning, CP Harris, RA Becker, JP Hearn. 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7844-7848.
- Thomson JA, J Kalishman, TG Golos, M Durning, CP Harris, JP Hearn. 1996. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod* 55, 254-259.
- Thomson JA, J Itskovitz-Eldor, SS Shapiro, MA Waknitz, JJ Swiergiel, VS Marshall, JM Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Toyooka Y, N Tsunekawa, R Akasu, T Noce. 2003. Embryonic stem cells can form germ cells *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 11457-11462.
- van Eijk MJ, MA van Rooijen, S Modina, L Scesi, G Folkers, HT van Tol, MM Bevers, SR Fisher, HA Lewin, D Rakacolli, C Galli, C de Vaureix, AO Trounson, CL Mummery, F Gandolfi. 1999. Molecular cloning, genetic mapping, and developmental expression of bovine POU5F1. *Biol Reprod* 60, 1093-1103.
- van Keulen LJ, A Bossers, F van Zijderveld. 2008. TSE pathogenesis in cattle and sheep. *Vet Res* 39, 24.
- van Stekelenburg-Hamers AE, TA Van Achterberg, HG Rebel, JE Flechon, KH Campbell, SM Weima, CL Mummery. 1995. Isolation and characterization of permanent cell lines from inner cell mass cells of bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 40, 444-454.
- Wakayama T, V Tabar, I Rodriguez, AC Perry, L Studer, P Mombaerts. 2001. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science* 292, 740-743.
- Wang B, J Zhou. 2003. Specific genetic modifications of domestic animals by gene targeting and animal cloning. *Reprod Biol Endocrinol* 13, 1-103.

- Wang L, E Duan, LY Sung, BS Jeong, X Yang, XC Tian. 2005. Generation and characterization of pluripotent stem cells from cloned bovine embryos. *Biol Reprod* 73, 149-155.
- Williams RL, DJ Hilton, S Pease, TA Willson, CL Stewart, DP Gearing, EF Wagner, D Metcalf, NA Nicola, NM Gough. 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687.
- Wobus AM, KR Boheler. 2005. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiol Rev* 85, 635-678.
- Xu C, MS Inokuma, J Denham, K Golds, P Kundu, JD Gold, MK Carpenter. 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 19, 971-974.
- Ying QL, J Nichols, I Chambers, A Smith. 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* 115, 281-292.
- Yu X, G Jin, X Yin, S Cho, J Jeon, S Lee, I Kong. 2008. Isolation and characterization of embryonic stem-like cells derived from *in vivo*-produced cat blastocysts. *Mol Reprod Dev* 75, 1426-1432.