

La terapia celular en la práctica médica (Revisión)

Tte. Cor. M.C. Gerardo Martín **González-López**,*

Mayor M.C. Dolores Javier **Sánchez-González**,†

Mayor M.C. Nayeli Isabel **Trejo-Bahena**,‡ BSC Marisol **Núñez-Sánchez**,§

Mayor M.C. Carlos Armando **Sosa-Luna**||

Universidad del Ejército y Fuerza Aérea. Ciudad de México.

RESUMEN

Después del descubrimiento de las células madre (Stem Cells) por Till y McCulloch en 1961, surgió el concepto de terapia celular que consiste en introducir o inducir la proliferación de células madre pluripotenciales dentro o fuera del organismo. El gran avance ha consistido en la obtención de células madre embrionarias por partenogénesis, la tecnología de ADN recombinante, la identificación y el cultivo de células. Hoy podemos cultivar células madre por muchos meses manteniéndolas en crecimiento dentro de cajas para cultivo. En estas condiciones las células madre mantienen la habilidad de formar diferentes tipos de células que van del músculo hasta la sangre y potencialmente se pueden diferenciar en cualquier tipo celular que constituye el cuerpo. La proliferación y potencial desarrollo de células madre embrionarias como promesa de salud humana depende de que el suministro de líneas células madre sea casi ilimitado, sus aplicaciones tanto para fines específicos como la investigación de farmacología y toxicología. La terapia celular es hoy en día un hecho gracias al trasplante con fines de restauración o regeneración de las células dañadas o perdidas por las enfermedades o lesiones. El reemplazo de las células perdidas por la quimioterapia oncológica en las leucemias (requiere de la terapia celular con el trasplante de médula ósea), las innovadoras técnicas de terapia celular en las enfermedades del corazón y enfermedad de Parkinson. La terapia celular tiene grandes implicaciones en la investigación básica y en la práctica médica.

Palabras clave: células madre, terapia celular, sistema nervioso central, enfermedad de Parkinson y regeneración celular.

Cell therapy in medical practice (Review)

SUMMARY

After the discovery of the Stem Cells for Till and McCulloch in 1961 the Cell-based therapies that consists on to introduce Stem Cells or to induce their proliferation inside or outside of the organism, the great advance consisted on the technology of DNA recombinant and cellular culture. Today we can maintain them for many months in growth inside in cultivate dishes, these remarkable Stem Cells have maintaining the ability to form cells ranging from muscle to nerve to blood - potentially any cell type that makes up the body. The proliferative and developmental potential of human Stem Cells promises an essentially unlimited supply of specific cell types for basic research as identify drug targets and test new therapeutics, understanding prevention and treatment of birth defects, study cell differentiation. The Cell-based therapies consist in transplantation Stem Cells for diseases ranging from heart disease to Parkinson's disease and leukaemia. Here we discuss the origin and properties of human Stem Cells, their implications for basic research and human medicine.

Key words: Stem Cells, Cell-based therapies, Regenerative Medicine.

* Jefe de la Sección de Investigación y Doctrina de la Escuela Médico Militar. SITECEMS.T. † Jefe de la Sub-Sección de Histología y Biología Celular de la Escuela Médico Militar. SITECEMS.T. ‡ Residente de la Especialidad en Medicina Física y Rehabilitación E.M.G.S. de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad. SITECEMS.T. § SITECEMS.T. || Jefe de la Sub-Sección de Evaluación y Profesor Titular de Farmacología 1 y 2 de la Escuela Médico Militar. SITECEMS.T.

Correspondencia:

Dr. Carlos Armando Sosa-Luna

Jefe de la Subsección de Farmacología. Profesor Titular en la Escuela Médico Militar y Escuela Militar de Graduados de Sanidad, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea. Cerrada de Palomas y Batalla de Celaya, Col. Lomas de San Isidro. C.P. 11200. Delegación Miguel Hidalgo, México D.F. Tel.: 540-7728, Ext. 143. Fax: 5520-2121. Correo electrónico: sosalunamc@mexico.com

Recibido: Octubre 31, 2007.

Aceptado: Agosto 10, 2008.

Introducción

La *terapia celular** se originó en el trabajo científico enfocado en resolver los problemas de la radiobiología clínica (Radiooncología), específicamente sobre la radiosensibilidad que existe en las células cancerosas y las células normales. Este trabajo pionero fue realizado por James Edgar Till y Ernest McCulloch en Toronto, y sus experimentos involucraban la metodología de inyectar células de la médula ósea en ratones irradiados. Ellos observaron nódulos en el bazo de los ratones, estos nódulos aparecían en proporción al número de células inyectadas de médula ósea; dieron el nombre a esos nódulos de “colonias del bazo” (spleen colonies) y posteriormente especularon sobre su origen. Estos experimentos realizados en el Ontario Cancer Institute del Princess Margaret Hospital desde 1961, culminaron con la demostración de la existencia de las células madre (Stem Cells) en 1963.¹⁻³ Las células madre en el bazo sobrevivieron al reconocimiento de los linfocitos y células NK (Natural Killer, asesinas naturales, respuesta inmune natural), (Figura 1) debido a que no expresan moléculas de reconocimiento antigénico como el complejo mayor de histocompatibilidad. Esto ha permitido que los experimentos de terapia celular con la introducción de células madre de diferentes especies (xenogénico) o individuos de la misma especie (alógeno) no se pierdan, brindando resultados terapéuticos prometedores.

Posteriormente se identificaron las células madre multipotenciales[†] formadoras de las células sanguíneas (HSC, por sus siglas en inglés), éstas pueden aislarse actualmente emplean-

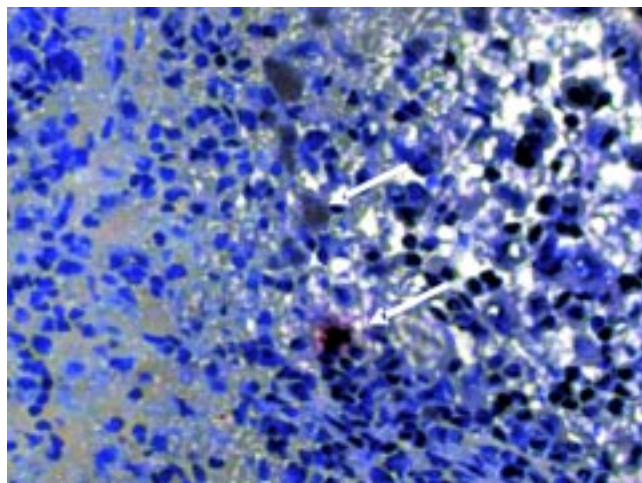


Figura 1. Células asesinas naturales (NK) en bazo de ratón. Las flechas señalan a las células NK detectadas con inmunohistoquímica con fosfatasa alcalina para NK. 400x.

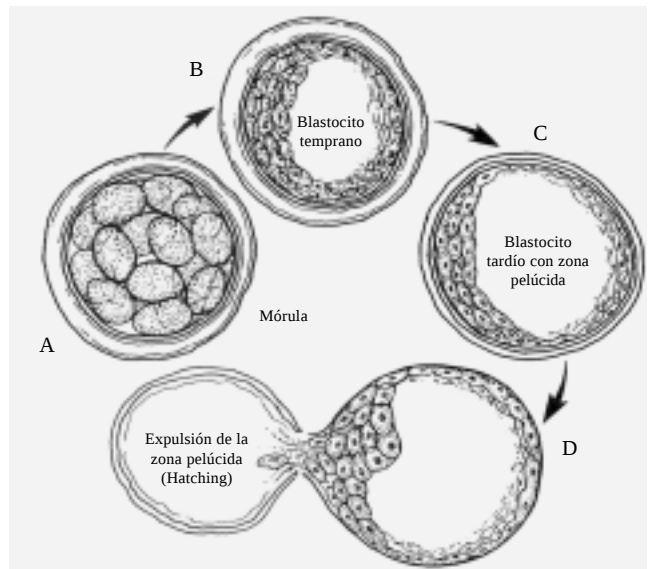


Figura 2. Mórula y blastocisto: en el periodo de pre-implantación embrionaria. A) Mórula. B) Blastocisto temprano. C) Blastocisto tardío con zona pelúcida. D) Expulsión de la zona pelúcida (Hatching).

do la tecnología de citometría de flujo de alta velocidad, marcando las células con anticuerpos monoclonales (FACs high-speed sorters) (sorting). La proporción es una célula madre sanguínea por cada 15,000 células madre de la médula ósea.⁴

Otra fuente de células madre pluripotenciales son las de origen embrionario (Embryonic Stem Cells; ESC) que conforman una masa de 50-150 células en el interior del blastocisto, éste se forma en el periodo de pre-implantación embrionaria, el que ocurre habitualmente 4 a 5 días después de que un óvulo ha sido fecundado por el espermatozoide (Figuras 2 y 3).⁵⁻⁷

Una apreciación global de las células madre en la práctica médica

Debido a su plasticidad y capacidad potencialmente ilimitada de auto-renovación[‡] (Figura 4), las ESC se han postulado para su empleo en la terapia celular como parte de la innovadora medicina de regeneración⁸ y reemplazo de tejidos,⁹ cuando ésta es necesaria después de que ocurre una lesión, enfermedad o el mismo envejecimiento.

Las células madre se han aislado de médula ósea, de células de tumores (Figura 5)⁹ de organismos jóvenes y adultos. Hoy en día inclusive se cuenta con células madre provenientes de la sangre del cordón umbilical (Figura 6) las que hasta el momento han sido ensayadas y tienen un gran potencial para tratar muchas enfermedades con éxito.^{10,11}

* Tratamiento en que se administra o induce a las células madre (Stem Cells) para que se diferencien en el tipo celular específico que se necesita para reparar células dañadas o sustituir a las que se destruyeron en los tejidos (Del inglés: Cell-based therapies y Regenerative medicine).

† Son células madre encontradas en el adulto; que pueden formar un número limitado de tipos celulares, cuando no se ha dado ningún estímulo para su diferenciación; es decir, cuando han crecido *in vitro*. El término pluripotenciales debe distinguirse de multipotenciales ya que el primero significa que pueden diferenciarse en todos los derivados celulares del: ectodermo, endodermo, y mesodermo. Éstas incluyen cada uno de los más de 220 tipos celulares en el cuerpo humano adulto.

‡ Se refiere a la característica de estas células madre que les permite dividirse para hacer las copias de ellas mismas (clonación) durante un periodo prolongado de tiempo (inmortales) sin que se lleguen a diferenciar.

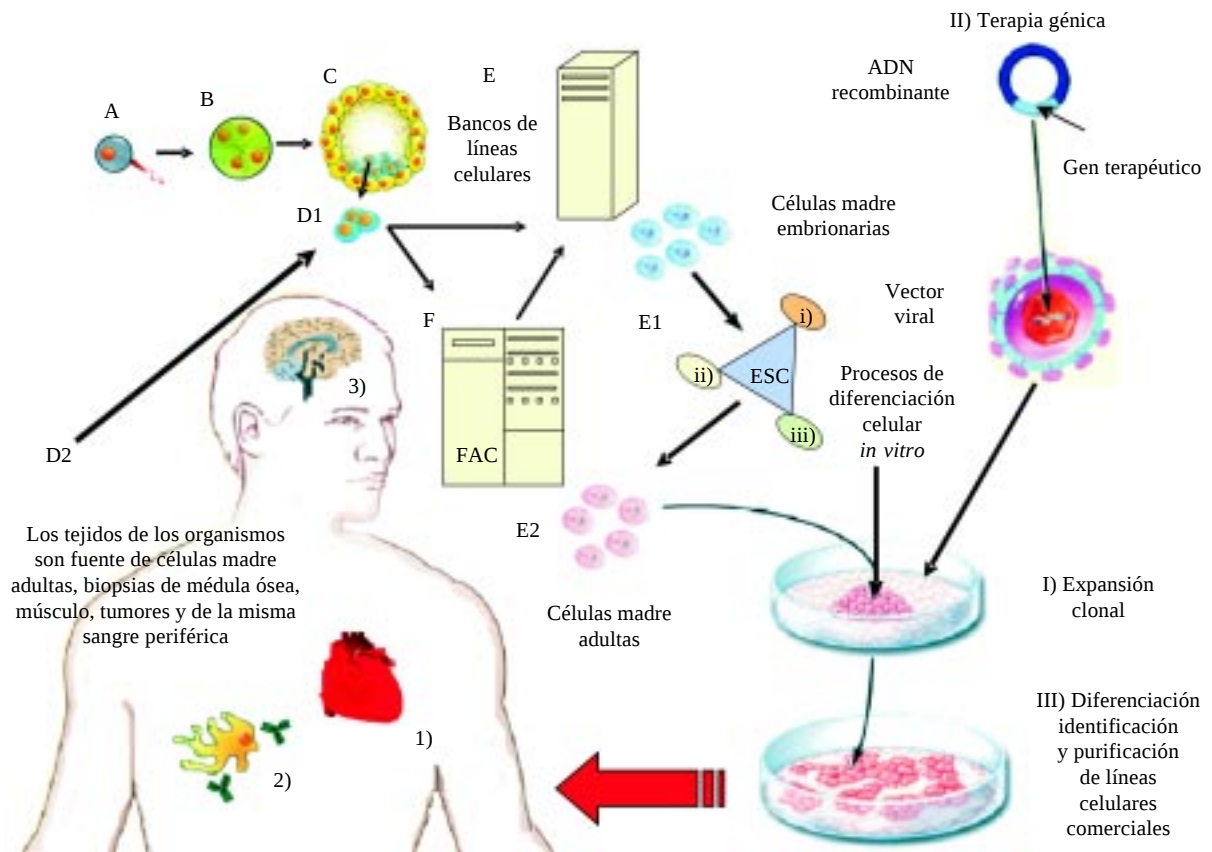


Figura 3. Terapia celular. Esquema que representa las fuentes de obtención de células madre para su posterior aplicación local o sistémica. **A)** Representa la fertilización del oocito y el espermatozoide, lo cual se puede realizar de forma natural, artificial o *in vitro*. **B)** Representa la mórula con las blastómeras que son células totipotenciales, esto ocurre a partir del 3er día de la fecundación. **C)** El blastocisto aparece el 5to día posterior a la fecundación y en su interior se encuentran las células madre embrionarias (ES) que tienen la característica de ser pluripotenciales. **D)** Células madre (D1 de origen embrionario y D2 de origen adulto). **E)** Bancos criogénicos con diferentes líneas de células madre (E1 líneas celulares comerciales de origen embrionario para terapia celular alogénica y xenogénica. E2 líneas celulares adultas para terapia celular autóloga, alogénica y xenogénica). La terapia celular requiere que las células madre sean cultivadas previamente en diferentes medios de cultivo con tres propósitos: expansión celular o clonal (I), modificación genética con ADN recombinante (II) y para su aislamiento, identificación y diferenciación *in vitro* (III). Los blancos terapéuticos reconocidos a nivel hospitalario más frecuentes son: 1) miocardio (corazón), 2) médula ósea (sangre) y 3) sustancia negra y estriado (cerebro). Las ESC pueden dar origen a diferentes tipos celulares derivados de: i) ectodermo, ii) mesodermo y iii) endodermo.

Enfermedades tratadas con células madre no embrionarias incluyen las de origen inmunohematológico, genético, cáncer, diabetes juvenil, Parkinson, ceguera y las lesiones de médula espinal. Hoy existe controversia por los problemas éticos que implica la terapia celular con ESC humanas,¹²⁻⁵² y también existe el riesgo técnico de que se produzca una enfermedad de injerto-contra-huésped asociado con el trasplante celular alogénico. Actualmente científicos de todo el mundo están resolviendo estos inconvenientes, como los asociados a la histocompatibilidad, empleando donación autóloga con los programas de congelación de células madre del cordón umbilical y con la aplicación de técnicas de ADN recombinante y clonación (Figura 3).^{10,11}

A partir del 2001 se han incrementado las publicaciones que fortalecen la terapia celular con ESC de origen humano, lo que ha fortalecido la evidencia científica de su capacidad de diferenciación en células que pueden ayudar a regenerar o recuperar la función del sistema nervioso,¹²⁻¹⁹ el tejido hematopoyético,²⁰⁻²⁷ el corazón,²⁸⁻³³ sistema circulatorio (endotelial),^{34,35} islotes de Langerhans pancreáticos (células B),^{36,37} hígado,³⁸⁻⁴⁰ hueso,⁴¹ trofoblasto^{42,43} y otros tejidos celulares.⁴⁴⁻⁵² Estos trabajos finalmente han fructificado en la reciente premiación que realizó el Instituto Karolinska de Estocolmo Suecia a Sir Martin J. Evans,^{*5} Mario Capecchi,[†] y Oliver Smithies;[‡] galardonados con el Premio Nóbel 2007 en fisiología y medicina por su trabajo sobre ESC que

* Nació en 1941 en la Gran Bretaña, ciudadano británico, Doctor en Ciencias en la especialidad de Anatomía y Embriología graduado en 1969, University College, Londres Reino Unido. Director de la Escuela de Biociencias y Profesor de genética de los mamíferos Cardiff University, Reino Unido.

† Nació en 1937 en Italia, ciudadano estadounidense Doctor en Ciencias en la especialidad de Biofísica graduado en 1967, Harvard University, Cambridge, MA, USA. Investigador del Howard Hughes Medical Institute y Profesor Distinguido en Biología y Genética Humana en la Universidad de Utah, Salt Lake City, UT, USA.

‡ Nació en 1925 en la Gran Bretaña, ciudadano estadounidense Doctor en Ciencias en la especialidad de Bioquímica en 1951, Oxford University, Reino Unido, Profesor de Excelencia en Patología y Laboratorio de Medicina en la University of North Carolina at Chapel Hill, NC, USA.

permitieron introducir cambios genéticos específicos con ADN recombinante en ratones ("knockout").^{52,53}

Hoy en día el gran avance de la inmunología ha esclarecido la fisiopatología de muchas enfermedades autoinmunitarias y se sabe que algunas células del sistema inmunitario que atacan los tejidos propios, involucran factores de riesgo genético;⁵⁴ muchos de estos genes sólo se expresan en las células sanguíneas. Investigaciones recientes han comprobado el potencial clínico de la aplicación de ESC en modelos experimentales de diabetes tipo 1, donde los trasplantes de ESC curaron a los ratones.⁵⁵ Se ha observado una tolerancia que permite un co-trasplante de células de los islotes pancreáticos para reemplazar las células B destruidas.⁵⁶ Estos resultados son muy alentadores para su aplicación en humanos ya que significa que muchas enfermedades autoinmunitarias pueden ser tratadas con ESC.

Una de las posibilidades terapéuticas menos consideradas para la terapia celular es el embarazo; el ambiente gestacional de un feto nos permite obtener mejores resultados terapéuticos que en el adulto. El importante avance para el diagnóstico prenatal permite hoy en día aislar células y ADN fetal a partir de sangre materna. El ambiente prenatal ofrece la vía intracavitaria peritoneal, tolerancia inmunológica lo que permite un potencial trasplante alogénico e inclusive células xenogénicas. Las células madre son numerosas en los tejidos fetales y además el tamaño fetal es menor al de un adulto, si consideramos que se requieren 10,000 células madre por kilogramo de peso y podemos iniciar un tratamiento en fetos con un peso 35 g *versus* los 70 kg promedio de un adulto.

Estos avances en las ciencias biomédicas hacen necesario buscar fuentes de obtención de células madre como son las mismas células cancerosas^{55,56} o ESC de mamíferos supe-

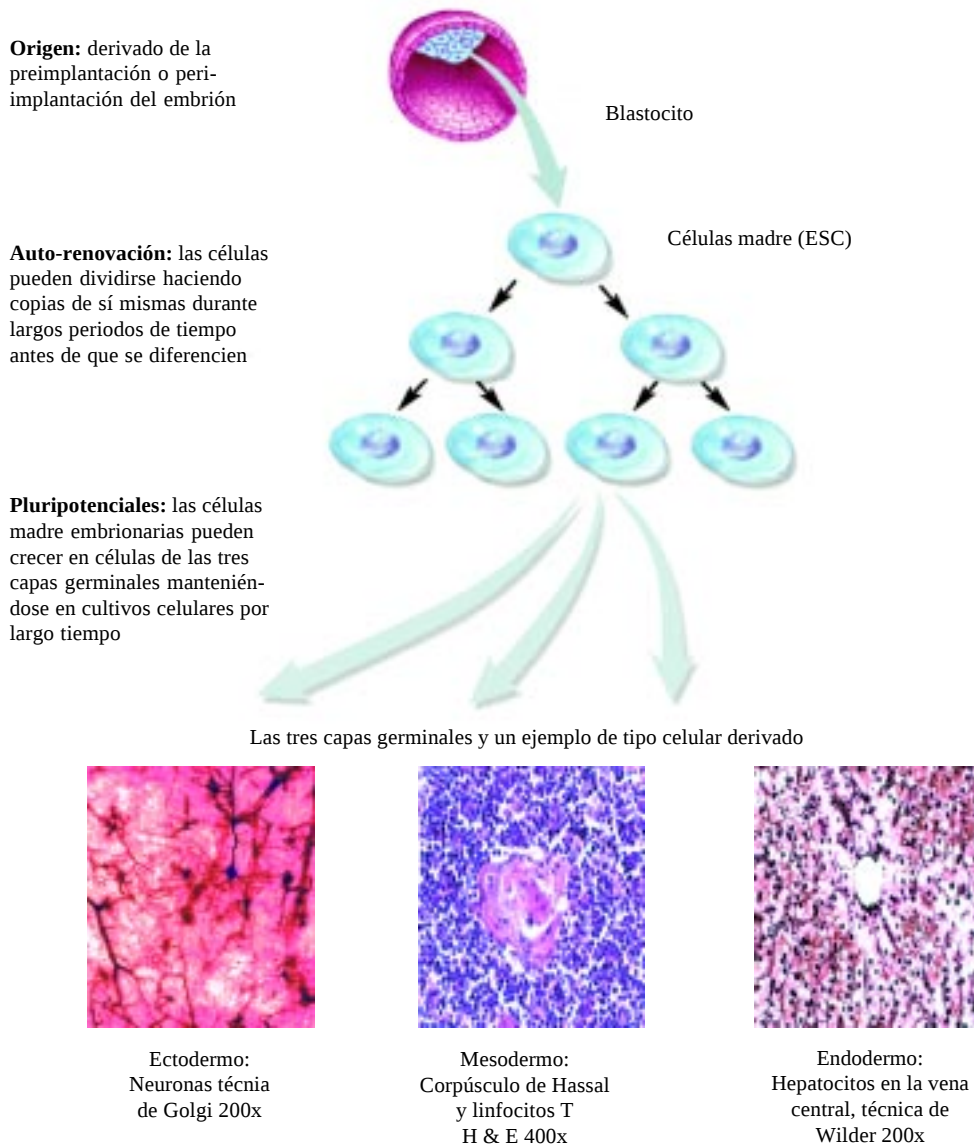


Figura 4. Características de la células madre embrionarias (ESC).

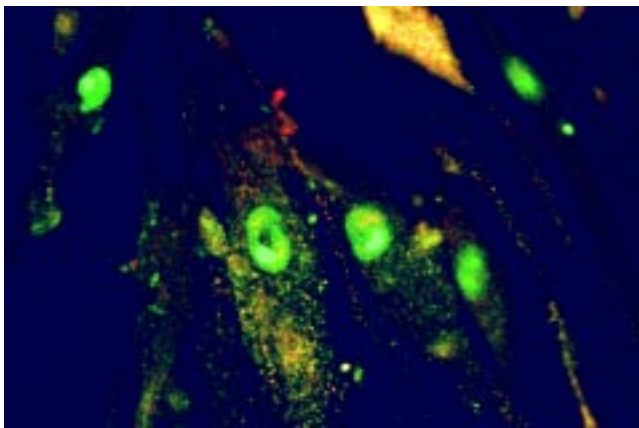


Figura 5. Fotografía de cultivo de células madre embrionarias de ratón teñidas con marcadores fluorescentes captadas por microscopia confocal 1000x.

riores como los primates.⁵⁷ Se han publicado otras aplicaciones para la salud como es el estudio toxicológico de nuevos medicamentos.^{58,59} La creación de bancos de HSC, ESC y otras células madre será cada día un procedimiento rutinario muy común gracias al crecimiento de donadores voluntarios o de sangre de cordón umbilical. Cerca de 4,000 a 10,000 muestras independientes permitirían implementar bancos de células madre capaces de satisfacer la demanda para el trasplante clínico o para protección contra accidentes de la radiación* (Figura 3).

Células madre y regeneración cardiaca

La principal causa de muerte en nuestro país son las enfermedades cardiovasculares, especialmente por infarto al

miocardio (IAM). Los avances en la cirugía de “By pass” y la angioplastia percutánea de las coronarias con colocación de “Stents” cardiacos ha mejorado sobre toda la sintomatología de la angina estable e inestable; sin embargo, no siempre tienen la capacidad de restaurar la función sobre todo en IAM que evolucionan a dilatación ventricular e insuficiencia cardiaca congestiva (ICC).

La terapia celular con cardiomiocitos previno el adelgazamiento cardiaco y la dilatación ventricular. La era de la cardiomioplastia celular inició con el Dr. Menasche en París en un estudio clínico fase I con pacientes referidos para una cirugía de “By pass” con infartos extensos, se obtenía una biopsia muscular, de la cual se aislaban mioblastos que eran cultivados de forma externa, los cuales fueron inyectados alrededor del infarto en el tiempo quirúrgico del “By pass”. Diez pacientes en un periodo de 1 a 2 años posterior a la cirugía de “By pass” y a la terapia celular, se encontraron libres de síntomas coronarios y mejoraron la función cardiaca de forma general, la cual fue evaluada en el ecocardiograma y sugirió una restauración de la función en la zona infartada. Los estudios de Medicina Nuclear con tomografía por emisión de positrones (PET) y tomografía por emisión de fotón único (Sestamibi Tc^{99m} y Talio-201) (SPECT) mostraron viabilidad en la región del infarto en zonas que no estaban presentes en el periodo preoperatorio. Dos pacientes murieron, uno por choque cardiogénico y otro murió 17 meses después por un evento vascular cerebral de tipo isquémico, en las autopsias se observó que los mioblastos se encontraban engarzados en la región del infarto, demostrándose la viabilidad del trasplante de células. Aunque las células se encontraron entre los miocitos estas células no presentaban la característica

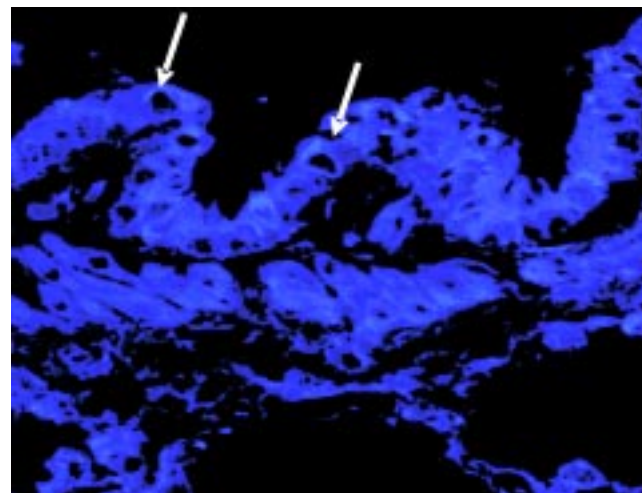
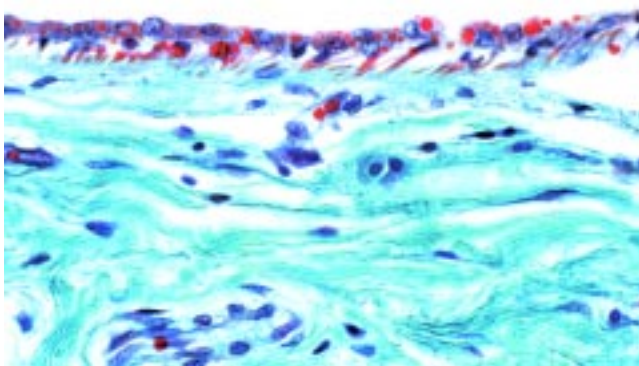


Figura 6. Fotografía del epitelio cúbico simple de un conducto excretor intralobular de la glándula mamaria (flechas), también se observan las células mioepiteliales ubicadas entre el epitelio y la membrana basal. Corte longitudinal. Izquierda Tricrómica de Gallego. 400x y derecha técnica de hibridación *in situ* fluorescente para el ARN de la sintasa de óxido nítrico endotelial en bronquiolo 1000x.

* La demanda puede incrementarse en caso de guerra o bioterrorismo nuclear o por el uso de armas químicas o biológicas con un enfoque en producir daño de la médula ósea.

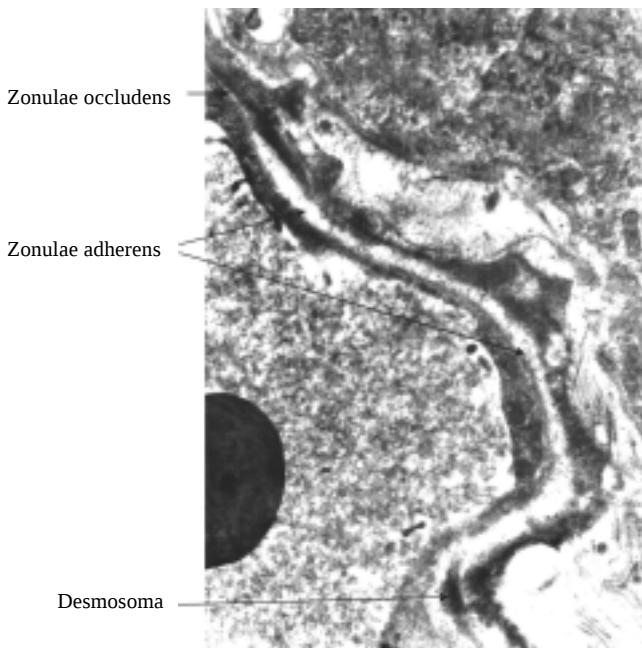


Figura 7. Fotografía de especializaciones de las membranas plasmáticas laterales de (uniones estrechas), se observa una unión oclusiva, una adherente y un desmosoma. MET. 30,000x.

de sincronización del latido debido a que no expresaban uniones estrechas “gap junctions” (Figura 7). En cuatro pacientes aparecieron arritmias y requirieron del implante de desfibriladores y el uso de amiodarona. Actualmente

este procedimiento de cardiomioplastia celular requiere de la inyección de 800,000,000 mioblastos.^{60,61}

Estudios actuales están demostrando que la regeneración celular del miocardio infartado proviene de la diferenciación de células madre residentes en el miocardio y de las provenientes de la médula ósea. Desafortunadamente este proceso puede ser insuficiente para prevenir la insuficiencia cardíaca en los infartos masivos y en los pacientes con cardiomiopatías.⁶²⁻⁶⁵

Células madre y regeneración cerebral

Desde 1960 existían algunos informes de la plasticidad cerebral y algunos incluso apuntaban hacia la posibilidad de que nuevas células nerviosas (neuronas) eran formadas en mamíferos adultos (a partir de la glía), este conocimiento no fue aplicado hasta la década del cerebro en los años noventa. Mientras la investigación médica se centró en un enfoque de limitar el daño una vez que había ocurrido, las recientes investigaciones de terapia celular están tratando de averiguar qué células pueden dar origen a las nuevas neuronas, las cuales pudieran ser cultivadas y administradas para restaurar la función del cerebro. Al igual que en el miocardio, al parecer existen algunos remanentes de células madres en las neuronas adultas, algunos de estas células adultas todavía retienen la habilidad de generar neuronas y neuroglías.^{66,67} Estos resultados son muy interesantes porque hacen pensar que en el cerebro, las células madre establecen un mecanismo que permite la regeneración; desafortunadamente

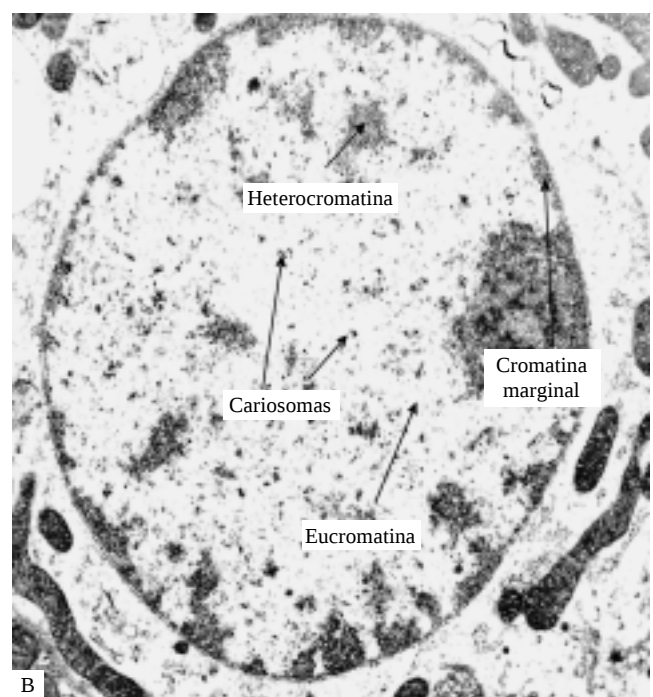
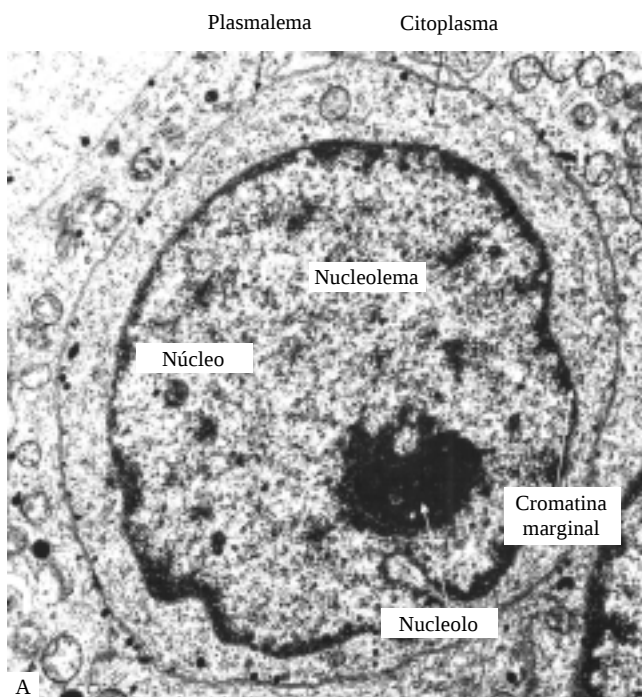


Figura 8. A) Micrografía de un núcleo interfásico donde se observa el nucléolo. El aspecto del nucléolo al microscopio electrónico es variable; en las células metabólicamente activas tienen un gran componente granular, centros fibrilares y un componente fibrilar denso, mismo que se encuentran incluidos en la matriz nuclear. MET 15,000x. **B)** Fotografía de un núcleo con abundante eucromatina. Se observan los cariosomas, la heterocromatina dispersa y la cromatina marginal. MET 15,000x.

tunadamente estas nuevas neuronas sólo son generadas en algunos sitios del cerebro como el hipocampo. Hoy en día, el progreso científico se ha concentrado en conocer la forma de identificar y aislar células madre neuronales, así como profundizar en los procesos de diferenciación y regeneración de las células nerviosas altamente especializadas.⁶⁸⁻⁷³

La esperanza es que la terapia con las células madre de origen neuronal nos permita resolver problemas tan complejos como la esquizofrenia y la esclerosis múltiple.⁷⁴ Hasta el momento, los avances más importantes se han realizado con modelos experimentales de enfermedades neurodegenerativas en donde se trata de reemplazar las neuronas productoras de dopamina en el estriado como es el caso de la enfermedad de Parkinson,⁷⁵⁻⁹¹ así como otras neuronas especializadas o la glía en la enfermedad de Huntington, la enfermedad de Lou Gehrig (mejor conocida como esclerosis lateral amiotrófica) y las lesiones del sistema nervioso central secundarias a isquemia o trauma.⁹²⁻¹⁰³

Células madres histocompatibles por partenogénesis

El dilema bioético de la utilización de células madre de origen embrionario para la investigación y terapia celular, es tema de debate legislativo y aprobación de Leyes de Investigación Biomédica en muchos países. Mientras que algunos escépticos consideran utópicos los efectos terapéuticos e inclusive se ha llegado a culpar de un complot para la clonación terapéutica encubierta. Lo único que realmente es cierto es que la terapia celular es un tema polémico de gran interés por los científicos y médicos que queremos resolver los problemas clínicos de nuestros pacientes.

El último avance en terapia celular corresponde al trabajo científico del 2007 realizado por Kim y colaboradores en el Hospital Pediátrico de Boston en los Estados Unidos,¹⁰⁴ quienes han desarrollado una técnica para mamíferos que permite obtener células madre “embrionarias”; recurriendo al proceso de partenogénesis, con citocalasina con lo que se inició la fase meiótica de oocitos de ratones (partición del oocito). Evitándose la fecundación del oocito por el espermatozoide anterior a la formación de la mórula y blastocisto. Tras este paso, se utilizó un sistema de genotipaje para identificar las células madre compatibles con el óvulo original y evitar problemas de rechazo al implantarlas al donante. De ser confirmados estos experimentos se abre una puerta que cierra la preocupación bioética y crítica que se genera en algunas personas y sociedades, argumentando que el uso de células madre embrionarias es un acto de destrucción o manipulación de “seres humanos” en estado embrionario, hallazgo que se uniría al estudio de células madre adultas y procedentes del cordón umbilical.

Independientemente del punto de vista bioético, el trasplante de células embrionarias en la terapia celular es una

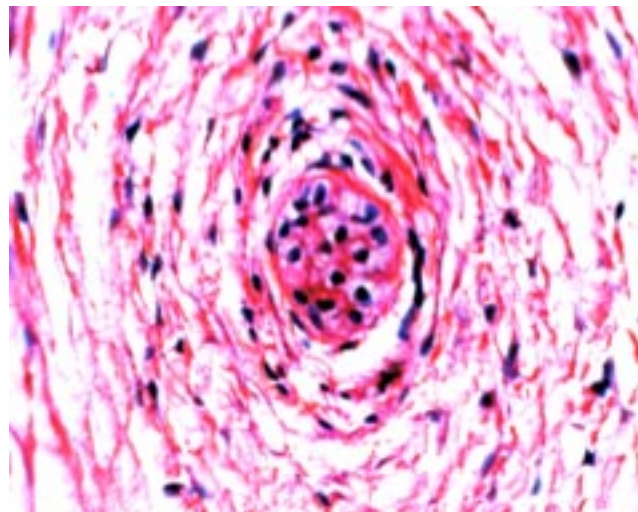


Figura 9. Tejido embrionario mucoide. Detalle del punto central del cordón umbilical en corte transversal, en donde se observan células madre. El ácido hialurónico se encuentra como componente principal de la sustancia fundamental del tejido conectivo de la gelatina de Wharton (sustancia gelatinosa del cordón umbilical). Hematoxilina y eosina 400x.

promesa y actualidad en la práctica médica de la primera década del siglo XXI.¹⁰⁵⁻¹⁰⁸

Discusión

La diferenciación celular, el envejecimiento y las enfermedades se reflejan a nivel celular por cambios en la capacidad de producción o síntesis de proteínas, por ejemplo, la deficiencia de enzimas antioxidantes (SOD),* o de las que se encargan de la reparación de ADN a nivel nuclear (polimerasas en sus tres isoformas). Los daños del ADN marcan la muerte celular, por lo anterior cuando el ADN es empaquetado en forma de cromatina dentro del núcleo celular éste es protegido del daño que pueda sufrir (heterocromatina). En el ámbito científico es conocido que para poder llevarse a cabo el proceso de transcripción y traducción de proteínas es necesario que el ADN sea expuesto (desenrollado) en la forma de eucromatina (*Figuras 8 y 9*). Las células diferenciadas empaquetan en la heterocromatina los genes que no se deben expresar y este mecanismo permite hacer grandes diferencias en las células especializadas; como las que encontramos entre una neurona y un melanocito. En este sentido la terapia celular con células madre al ser introducidas en el huésped enfermo, por vía sistémica, puede llegar al órgano blanco, ya que no expresan proteínas de membrana lo que les permiten pasar inadvertidas a la vigilancia del sistema inmune. Estas células madre al no estar diferenciadas poseen en el interior del núcleo los segmentos de ADN no enrollados (eucromatina) que las células adultas o enfer-

*Superóxido dismutasa. (En nuestro laboratorio se ha podido determinar que en los pacientes con Demencia Senil tipo Alzheimer presentan concentraciones promedio menores de SOD respecto a los controles).

mas no tienen o se encuentran en forma de heterocromatina (ADN enrollado). Las células madre tienen la capacidad de transcribir y traducir proteínas que no se están produciendo en el huésped motivo por el cual se producen los signos y síntomas de la enfermedad o el envejecimiento. Muchas de las proteínas que sí se sintetizan en las células madre concuerdan con las que están necesitando las células enfermas o envejecidas y si no son suplidas terminan con la vida de la célula. La terapia celular permite sustituir a las células muertas y revitalizar a las células enfermas.¹⁰⁹

Aunque existe la posibilidad de que las células madre al ser introducidas en el huésped enfermo sean identificadas y destruidas por el sistema inmune, existe un mecanismo de herencia horizontal recientemente descrita por Sánchez-Vázquez¹⁰⁹ que permite la mejoría de los pacientes que reciben terapia celular alogénica y xenogénica, ya que el ARNm del interior de las células madre puede ser transferido a las células enfermas o envejecidas del huésped. Las células madre contienen ARNm que codifica proteínas que pueden tener actividad funcional (antioxidante, antitumoral, antienvjecimiento, de regeneración, de proliferación, de reparación de ADN, etc.), estos ARNm al ser transferidos a otras células permiten restaurar la capacidad de síntesis de proteínas, adquiriendo nuevamente su capacidad normal, este mecanismo de regeneración celular por herencia horizontal ha sido objeto de búsqueda por parte de los investigadores que han tratado de implantar la terapia génica en la práctica médica. A diferencia de la terapia celular, la terapia génica a empleado el viejo paradigma de la herencia vertical, que consiste en el empleo de tecnología recombinante que trata de insertar ADN en los órganos blanco, diversos estudios clínicos a finales del siglo XX fueron ensayados, empleando múltiples estrategias, técnicas y procedimientos, con el inconveniente de que se buscaba el vehículo ideal para hacer llegar el gen terapéutico, a estos transportadores de genes se les llamó vectores (virus, micro-esferas, liposomas, etc.). Sin embargo, a la luz de la terapia celular y la hipótesis Sánchez-Vázquez,¹⁰⁹ parece ser que la célula es el mejor vehículo y es la que permite insertar de mejor forma genes terapéuticos, al encontrarse disponibles las células madre en líneas de cultivos de células madre (procedimiento *in vitro*). La fusión de la terapia génica con la terapia celular permitirá cambiar el paradigma de la farmacología limitada por la modulación de proteínas funcionales a la posibilidad de generar proteína bioactivas desde el interior del organismo como un novedoso paradigma de la farmacología. En este contexto, la terapia celular se vislumbra como la terapia más avanzada, la cual nos permite dejar de lado la manipulación del ADN y el uso *in vivo* de vectores genéticamente modificados que por su naturaleza infecciosa deben considerarse como riesgosos (virus) (Figura 3).¹⁰⁹

Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por el Sistema Nacional de Investigadores del CONACyT (Apoyo No. 33834 y No.

189174), Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, por la Fundación Gonzalo Río Arronte IAP y el Laboratorio de Histología de la Escuela Médico Militar, Universidad del Ejército y Fuerza Aérea.

Referencias

1. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research* 1961; 14: 213-22.
2. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963; 197: 452-4.
3. Siminovich L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 1963; 62: 327-36.
4. Evers, et al. Stem Cells in Clinical Practice. *J Am Coll Surg* Vol 2003; 197: 458-78.
5. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292, 154-6.
6. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.
7. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 78: 7634-8.
8. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
9. Hoffman DI, Zellman GL, Fair CC, et al. Cryopreserved embryos in the United States and their availability for research. *Fertil Steril* 2003; 79: 1063-9.
10. Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. *Crit Rev Oncol Hematol* 2003; 48: 35-43.
11. Koh LP, Chao NJ. Umbilical cord blood transplantation in adults using myeloablative and nonmyeloablative preparative regimens. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004; 10: 1-22.
12. Lee DH, Park S, Kim EY, et al. Enhancement of re-closure capacity by the intra-amniotic injection of human embryonic stem cells in surgically induced spinal open neural tube defects in chick embryos. *Neurosci Lett* 2004; 364: 98-100.
13. Carpenter MK, Inokuma MS, Denham J, Mujtaba T, Chiu CP, Rao MS. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol* 2001; 172: 383-97.
14. Park S, Lee KS, Lee YJ, et al. Generation of dopaminergic neurons in vitro from human embryonic stem cells treated with neurotrophic factors. *Neurosci Lett* 2004; 359: 99-103.
15. Reubinoff BE, Itsykson P, Turetsky T, et al. Neural progenitors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 1134-40.
16. Schuldiner M, Eiges R, Eden A, et al. Induced neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *Brain Res* 2001; 913: 201-5.
17. Schulz TC, Palmarini GM, Noggle SA, Weiler DA, Mitalipova MM, Condie BG. Directed neuronal differentiation of human embryonic stem cells. *BMC Neurosci* 2003; 4: 27.
18. Zhang SC, Wernig M, Duncan ID, Brustle O, Thomson JA. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* 2001; 19: 1129-33.
19. Cerdan C, Rouleau A, Bhatia M. VEGF-A165 augments erythropoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* 2004; 103: 2504-12.
20. Chadwick K, Wang L, Li L, et al. Cytokines and BMP-4 promote hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells. *Blood* 2003; 102: 906-15.
21. Kaufman DS, Hanson ET, Lewis RL, Auerbach R, Thomson JA. Hematopoietic colony-forming cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10716-21.

22. Lu SJ, Li F, Vida L, Honig GR. CD34+CD38- hematopoietic precursors derived from human embryonic stem cells exhibit an embryonic gene expression pattern. *Blood* 2004; 103: 4134-41.
23. Tian X, Kaufman DS. Hematopoietic development of human embryonic stem cells in culture. *Methods Mol Biol* 2004; 290: 149-62.
24. Vodyanik MA, Bork JA, Thomson JA, Slukvin II. Human embryonic stem cell-derived CD34+ cells: efficient production in the co-culture with OP9 stromal cells and analysis of lymphohematopoietic potential. *Blood* 2004.
25. Wang L, Li L, Shojaei F, et al. Endothelial and hematopoietic cell fate of human embryonic stem cells originates from primitive endothelium with hemangioblastic properties. *Immunity* 2004; 21: 31-41.
26. Zhan X, Dravid G, Ye Z, et al. Functional antigen-presenting leucocytes derived from human embryonic stem cells in vitro. *Lancet* 2004; 364: 163-71.
27. He JQ, Ma Y, Lee Y, Thomson JA, Kamp TJ. Human embryonic stem cells develop into multiple types of cardiac myocytes: action potential characterization. *Circ Res* 2003; 93: 32-9.
28. Mummery C, Ward-van Oostwaard D, Doevendans P, et al. Differentiation of human embryonic stem cells to cardiomyocytes: role of coculture with visceral endoderm-like cells. *Circulation* 2003; 107: 2733-40.
29. Vanderlaan RD, Oudit GY, Backx PH. Electrophysiological profiling of cardiomyocytes in embryonic bodies derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2003; 93: 1-3.
30. Kehat I, Amit M, Gepstein A, Huber I, Itskovitz-Eldor J, Gepstein L. Development of cardiomyocytes from human ES cells. *Methods Enzymol* 2003; 365: 461-73.
31. Satin J, Kehat I, Caspi O, et al. Mechanism of spontaneous excitability in human embryonic stem cell derived cardiomyocytes. *J Physiol* 2004; 559: 479-96.
32. Xu C, Police S, Rao N, Carpenter MK. Characterization and enrichment of cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells. *Circ Res* 2002; 91: 501-8.
33. Gerecht-Nir S, Ziskind A, Cohen S, Itskovitz-Eldor J. Human embryonic stem cells as an in vitro model for human vascular development and the induction of vascular differentiation. *Lab Invest* 2003; 83: 1811-20.
34. Levenberg S, Golub JS, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Langer R. Endothelial cells derived from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 4391-6.
35. Assady S, Maor G, Amit M, Itskovitz-Eldor J, Skorecki KL, Tzukerman M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 2001; 50: 1691-7.
36. Segev H, Fishman B, Ziskind A, Shulman M, Itskovitz-Eldor J. Differentiation of human embryonic stem cells into insulin producing clusters. *Stem Cells* 2004; 22: 265-74.
37. Lavon N, Yanuka O, Benvenisty N. Differentiation and isolation of hepatic-like cells from human embryonic stem cells. *Differentiation* 2004; 72: 230-8.
38. Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, Peng Y, Carpenter MK. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells. *Cell Transplant* 2003; 12: 1-11.
39. Shirahashi H, Wu J, Yamamoto N, et al. Differentiation of human and mouse embryonic stem cells along a hepatocyte lineage. *Cell Transplant* 2004; 13: 197-211.
40. Sottile V, Thomson JA, McWhir J. In vitro osteogenic differentiation of human ES cells. *Cloning Stem Cells* 2003; 5: 149-55.
41. Gerami-Naini B, Dovzhenko OV, Durning M, Wegner FH, Thomson JA, Golos TG. Trophoblast differentiation in embryoid bodies derived from human embryonic stem cells. *Endocrinology* 2004; 145: 1517-24.
42. Xu RH, Chen X, Li DS, et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 1261-4.
43. Pera MF, Andrade J, Houssami S, et al. Regulation of human embryonic stem cell differentiation by BMP-2 and its antagonist noggin. *J Cell Sci* 2004; 117: 1269-80.
44. Clark AT, Bodnar MS, Fox M, et al. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum Mol Genet* 2004; 13: 727-39.
45. Calhoun JD, Rao RR, Warrenfeltz S, et al. Transcriptional profiling of initial differentiation events in human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 323: 453-64.
46. Conley BJ, Trounson AO, Mollard R. Human embryonic stem cells form embryoid bodies containing visceral endoderm-like derivatives. *Fetal Diagn Ther* 2004; 19: 218-23.
47. Dang SM, Gerecht-Nir S, Chen J, Itskovitz-Eldor J, Zandstra PW. Controlled, scalable embryonic stem cell differentiation culture. *Stem Cells* 2004; 22: 275-82.
48. Dang SM, Zandstra PW. Scalable production of embryonic stem cell-derived cells. *Methods Mol Biol* 2004; 290: 353-64.
49. Gertow K, Wolbank S, Rozell B, et al. Organized development from human embryonic stem cells after injection into immunodeficient mice. *Stem Cells Dev* 2004; 13: 421-35.
50. Goldstein RS, Drukker M, Reubinoff BE, Benvenisty N. Integration and differentiation of human embryonic stem cells transplanted to the chick embryo. *Dev Dyn* 2002; 225: 80-6.
51. Levenberg S, Huang NF, Lavik E, Rogers AB, Itskovitz-Eldor J, Langer R. Differentiation of human embryonic stem cells on three-dimensional polymer scaffolds. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 12741-6.
52. McDevitt HO. The role of MHC class II molecules in susceptibility and resistance to autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 677-81.
53. Beilhack GF, Landa RR, Masek MA, Shizuru JA. Prevention of type 1 diabetes with major histocompatibility complex-compatible and nonmarrow ablative hematopoietic stem cell transplants. *Diabetes* 2005; 54: 1770-9.
54. Beilhack GF, Scheffold YC, Weissman IL, et al. Purified allogeneic hematopoietic stem cell transplantation blocks diabetes pathogenesis in NOD mice. *Diabetes* 2003; 52: 59-68.
55. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-11.
56. Hope KJ, Jin L, Dick JE. Human acute myeloid leukemia stem cells. *Arch Med Res* 2003; 34: 507-14.
57. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 7844-8.
58. Bremer S, Hartung T. The use of embryonic stem cells for regulatory developmental toxicity testing in vitro - the current status of test development. *Curr Pharm Des* 2004; 10: 2733-47.
59. Rolletschek A, Blyszczuk P, Wobus AM. Embryonic stem cell-derived cardiac, neuronal and pancreatic cells as model systems to study toxicological effects. *Toxicol Lett* 2004; 149: 361-9.
60. Menasché P. Cell transplantation in myocardium. *Ann Thorac Surg* 2003; 75: S20-S28.
61. Menasché P. Cellular Therapy in Thoracic and Cardiovascular Disease. *Ann Thorac Surg* 2007; 84: 339-42.
62. Urbanek K, Torella D, Sheikh F, De Angelis A, Nuszynska D, Silvestri F, et al. Myocardial regeneration by activation of multipotent cardiac stem cells in ischemic heart failure. *PNAS* 2005; 102: 8692-7.
63. Bearzi C, Rota M, Hosoda T, Tillmanns J, Nascimbene A, De Angelis A, et al. Human cardiac stem cells. *PNAS* 2007; 104: 14068-73.
64. Tse HF, Lau CP. Therapeutic Angiogenesis with Bone Marrow-Derived Stem Cells *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 2007; 12: 89-97.
65. Ahuja P, Sdek P, MacLellan WR. Cardiac Myocyte Cell Cycle Control in Development, Disease, and Regeneration. *Physiol Rev* 2007; 87: 521-44.
66. Van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 2002; 415: 1030-4.
67. Kempermann G, Wiskott L, Gage HF. Functional significance of adult neurogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* 2004; 14: 186-91.
68. Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS. Specific MicroRNAs Modulate Embryonic Stem Cell-Derived Neurogenesis *Stem Cells* 2006; 24: 857-64.
69. Pruszak J, Sonntag KC, Aung MH, Sanchez-Pernaute R, Isacs O. On Markers and Methods for Cell Sorting of Human Embryonic Stem Cell-Derived. *Neural Cell Populations Stem Cells* 2007; 25: 2257-68.
70. Wu H, Xu J, Pang ZP, Ge W, Kim KJ, Bianchi B, et al. Integrative genomic and functional analyses reveal neuronal subtype differentiation bias in human embryonic stem cell lines. *PNAS* 2007; 104: 13821-6.

71. Brunlid G, Pruszk J, Holmes B, Isacson O, Sonntag KC. Immature and Neurally Differentiated Mouse Embryonic Stem Cells Do Not Express a Functional Fas/Fas Ligand System. *Stem Cells* 2007; 25: 2551-8.
72. Sathyan P, Golden HB, Miranda RC. Competing Interactions between Micro-RNAs Determine Neural Progenitor Survival and Proliferation after Ethanol Exposure: Evidence from an Ex Vivo Model of the Fetal Cerebral Cortical Neuroepithelium. *J Neurosci* 2007; 27: 8546-7.
73. Mehler MF, Mattick JS. Non-coding RNAs in the nervous system. *J Physiol* 2006; 575: 333-41.
74. Reif A, Fritzen S, Finger M, Strobel A, Lauer M, Schmitt A, Lesch KP. Neural stem cell proliferation is decreased in schizophrenia, but not in depression. *Mol Psychiatry* 2006; 11: 514-22.
75. Backlund EO, Granberg PO, Hamberger P, et al. Transplantation of adrenal medullary tissue to striatum in parkinsonism. First clinical trials. *J Neurosurg* 1985; 62: 169-73.
76. Madrazo I, Drucker-Colin R, Diaz V, Martinez-Mata J, Torres C, Becerril JJ. Open microsurgical autograft of adrenal medulla to the right caudate nucleus in two patients with intractable Parkinson's disease. *N Engl J Med* 1987; 316: 831-4.
77. Olson L, Malmfors T. Growth characteristics of adrenergic nerves in the adult rat. Fluorescence histochemical and 3H-noradrenaline uptake studies using tissue transplantations to the anterior chamber of the eye. *Acta Physiol Scand Suppl* 1970; 348: 1-112.
78. Madrazo I, Leon V, Torres C, et al. Transplantation of fetal substantia nigra and adrenal medulla to the caudate nucleus in two patients with Parkinson's disease. *N Engl J Med* 1988; 318: 51.
79. Lindvall O, Rehnström S, Brundin P, et al. Human fetal dopamine neurons grafted into the striatum in two patients with severe Parkinson's disease. A detailed account of methodology and a 6-month follow-up. *Arch Neurol* 1989; 46: 615-31.
80. Freed CR, Greene PE, Breeze RE, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. *N Engl J Med* 2001; 344: 710-9.
81. Olanow CW, Goetz CG, Kordower JH, et al. A double-blind controlled trial of bilateral fetal nigral transplantation in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2003; 54: 403-14.
82. Hagell P, Piccini P, Björklund A, et al. Dyskinesias following neural transplantation in Parkinson's disease. *Nat Neurosci* 2002; 5: 627-8.
83. Mendez I, Dagher A, Hong M, et al. Simultaneous intrastriatal and intranigral fetal dopaminergic grafts in patients with Parkinson disease: a pilot study. Report of three cases. *J Neurosurg* 2002; 96: 589-96.
84. Studer L, Tabar V, McKay RD. Transplantation of expanded mesencephalic precursors leads to recovery in parkinsonian rats. *Nat Neurosci* 1998; 1: 290-5.
85. Björklund LM, Sanchez-Pernate R, Chung S, et al. Embryonic stem cells develop into functional dopaminergic neurons after transplantation in a Parkinsonian rat model. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 2344-9.
86. Perrier AL, Tabar V, Barberi T, et al. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 12543-8.
87. Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, et al. Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice. *Nat Biotechnol* 2003; 21: 1200-7.
88. Vrana KE, Hipp JD, Goss AM, et al. Nonhuman primate parthenogenetic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 11911-6.
89. Fallon J, Reid S, Kinyamu R, et al. In vivo induction of massive proliferation, directed migration, and differentiation of neural cells in the adult mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 14686-91.
90. Lie DC, Dzieczapolski G, Willhoite AR, Kaspar BK, Shults CW, Gage FH. The adult substantia nigra contains progenitor cells with neurogenic potential. *J Neurosci* 2002; 22: 6639-49.
91. Zhao M, Momba S, Delfani K, et al. Evidence for neurogenesis in the adult mammalian substantia nigra. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 7925-30.
92. Liu S, Qu Y, Stewart TJ, et al. Embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes and myelinate in culture and after spinal cord transplantation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6126-31.
93. Harper JM, Krishnan C, Darman JS, et al. Axonal growth of embryonic stem cell-derived motoneurons in vitro and in motoneuron-injured adult rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 7123-8.
94. Nistor GI, Totiu MO, Haque N, Carpenter MK, Keirstead HS. Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia* 2005; 49: 385-96.
95. Brustle O, Jones KN, Learish RD, et al. Embryonic stem cell-derived glial precursors: a source of myelinating transplants. *Science* 1999; 285: 754-6.
96. Keirstead HS, Nistor G, Bernal G, et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 2005; 25: 4694-705.
97. Kerr DA, Llado J, Shambloot MJ, et al. Human embryonic germ cell derivatives facilitate motor recovery of rats with diffuse motor neuron injury. *J Neurosci* 2003; 23: 5131-40.
98. Klein SM, Behrstock S, McHugh J, et al. GDNF delivery using human neural progenitor cells in a rat model of ALS. *Hum Gene Ther* 2005; 16: 509-21.
99. Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 2002; 8: 963-70.
100. Nakatomi H, Kuriu T, Okabe S, et al. Regeneration of hippocampal pyramidal neurons after ischemic brain injury by recruitment of endogenous neural progenitors. *Cell* 2002; 110: 429-41.
101. Park KI, Teng YD, Snyder EY. The injured brain interacts reciprocally with neural stem cells supported by scaffolds to reconstitute lost tissue. *Nat Biotechnol* 2002; 20: 1111-7.
102. Kelly S, Bliss TM, Shah AK, et al. Transplanted human fetal neural stem cells survive, migrate, and differentiate in ischemic rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 11839-44.
103. Imitola J, Raddassi K, Park KI, et al. Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 18117-22.
104. Kim K, Lerou P, Yabuuchi A, Lengerke C, Ng K, West J, et al. Histocompatible embryonic stem cells by parthenogenesis. *Science* 2007; 315: 482-6.
105. Talbot NC, Powell AM, Camp M, Ealy AD. Establishment of a bovine blastocyst-derived cell line collection for the comparative analysis of embryos created in vivo and by in vitro fertilization, somatic cell nuclear transfer, or parthenogenetic activation. *In vitro Cell Dev Biol Anim* 2007; 43: 59-71.
106. Lee ST, Choi MH, Lee EJ, Gong SP, Jang M, Park SH, et al. Establishment of autologous embryonic stem cells derived from preantral follicle culture and oocyte parthenogenesis. *Fertil Steril* 2007.
107. Lengerke C, Kim K, Lerou P, Daley GQ. Differentiation potential of hitocompatible parthenogenetic embryonic stem cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1106: 209-18.
108. Fang ZF, Gai H, Huang YZ, Li SG, Chen XJ, Shi JJ, et al. Rabbit embryonic stem cell lines derived from fertilized, parthenogenetic or somatic cell nuclear transfer embryos. *Exp Cell Res* 2006; 312: 3669-82.
109. Sánchez-González DJ, Trejo-Bahena NI. *Biología Celular y Molecular*. México: Editorial Alfil; 2006.