

Células totipotenciales hematopoyéticas y progenitores del sistema hematopoyético

Héctor Mayani-Viveros*

Origen de las células totipotenciales hematopoyéticas

La sangre humana está compuesta por varios tipos de células que ejecutan diversas funciones en el organismo. Los eritrocitos transportan el oxígeno; las plaquetas controlan la coagulación sanguínea; los linfocitos, monocitos y granulocitos intervienen en la defensa inmunitaria contra cuerpos extraños como bacterias y virus. Todas estas células son generadas a partir de una misma célula: la célula totipotencial hematopoyética.^{1,2} Esta última tiene la capacidad de autorrenovarse y dar origen a precursores hematopoyéticos, los cuales proliferan y se diferencian repetidas veces dando lugar a células maduras con cualidades reducidas de proliferación. Únicamente los macrófagos, células cebadas y linfocitos conservan la capacidad de dividirse en la madurez^{3,4,5} (Figura 1).

Durante el desarrollo del embrión humano, las primeras células totipotenciales hematopoyéticas aparecen en el saco vitelino, luego migran al hígado y de ahí a la médula ósea por el torrente circulatorio. La migración es una propiedad de estas células y que está mediada por factores quimioattractantes presentes en los sitios de destino. En estado embrional las células hematopoyéticas poseedoras del receptor c-kit siguen un gradiente del Factor de la Célula Totipotencial (*Stem Cell Factor, SCF*) o ligando de Kit de tipo membranal expresado por los fibroblastos, que actúa como centro de atracción. Este fenómeno conocido como haptotaxis dirige la migración igualmente de las células germinales y melanocitos.⁶ Se asumía que las células hematopoyéticas en estado adulto, permanecían indiferenciadas y dentro de la médula ósea, las cuales conforme adquirían la madurez salían a la circulación. Inclusive la expresión del antígeno CD34, otorgaría residencia permanente dentro del microambiente medular. Pero recientes observaciones indican que las células CD34+ están presentes en la sangre periférica, y que conservan su capacidad de repoblar y reconstituir la hematopoyesis⁷

Actualmente se sabe de la existencia de otras fuentes de células hematopoyéticas CD34+ como el hígado fetal y el cordón umbilical, cuya capacidad de autorrenovación y formación de nueva sangre está en investigación. Se considera que la célula totipotencial hematopoyética proveniente de cualquiera de estas fuentes tiene inherente la capacidad de producir dos células con cualidades diferentes, una de estas células continúa su diferenciación ulterior y la otra permanece siendo totipotencial. La célula totipotencial hematopoyética humana ha

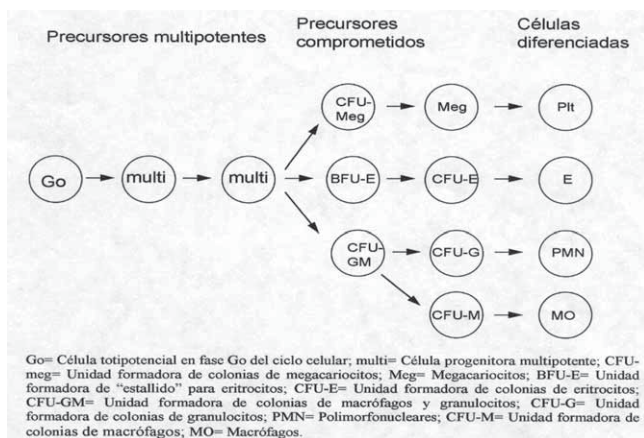


Figura 1. Diagrama jerárquico de la hematopoyesis mostrando únicamente la diferenciación de la rama mieloide.

* Laboratorio de Hematopoyesis, Unidad de Investigaciones Oncológicas, CMN Siglo XXI.

permanecido por mucho tiempo siendo un misterio: ahora está por convertirse en una realidad. La purificación de la célula totipotencial puede hacerse por selecciones positivas de células portando ciertos antígenos (CD34, Thy-1) combinando con selecciones negativas para los antígenos de diferenciación (CD38, CD13, etc.). Las células CD34+ primitivas en su conjunto no están constituidas por una población homogénea, sino que reagrupan diferentes subpoblaciones teniendo potenciales de proliferación y diferenciación variables para producir los progenitores linfo-mieloides.⁸ El ensayo original para detectar células totipotenciales es el ensayo de formación de colonias en bazo al día 12 (CFU-S).⁹ Por muchos años las CFU-S se consideraron equivalentes a las células totipotenciales. Pero esto ha sido cuestionado últimamente.¹⁰ Estos trabajos publicados han demostrado que aunque los progenitores reconstituyentes de la hematopoyesis a largo y corto plazo tienen actividad de CFU-S, la mayoría de los CFU-S de día 12 es progenitor transitorio.¹¹ La célula totipotencial más primitiva usualmente tiene una actividad pre-CFU-S.¹² Son demasiado primitivas como para formar colonias al día 12, pero dan lugar a progenitores que pueden hacerlo.

Las células totipotenciales hematopoyéticas CD34+ residen en el microambiente medular principalmente, donde probablemente se establecen las interacciones regulatorias esenciales.¹³ Parece ser que la localización de las células totipotenciales en cercana interacción con las células estromales de la médula ósea, es crítica para su proliferación y diferenciación. Es probable que varias proteínas de adhesión sean importantes en el proceso de localización de las células totipotenciales para recibir los mensajes provenientes de las células estromales. El concepto de la hematopoyesis normal ha evolucionado mucho en los últimos años, porque antes se pensaba que la acción de los factores humorales era puntual. Ahora se sabe que existe una múltiple interacción de elementos que intervienen en el proceso de formación de la sangre. Estos elementos reguladores son complejos múltiples que están probablemente localizados en la superficie de las células estromales y de las células hematopoyéticas (Figura 2). Esta interacción celular da lugar a la estimulación parácrina por parte de las células

estromales hacia los progenitores hematopoyéticos y a la estimulación autócrina o autoestimuladora de las células hematopoyéticas CD34+.

El cultivo *in vitro* que más se acerca al estado fisiológico es el crecimiento de células totipotenciales sobre células estromales.¹⁴ El estroma es una capa de células adherentes que pueden crecer *in vitro* a partir de tejidos hematopoyéticos y que producen factores necesarios para la hematopoyesis (Figura 2).

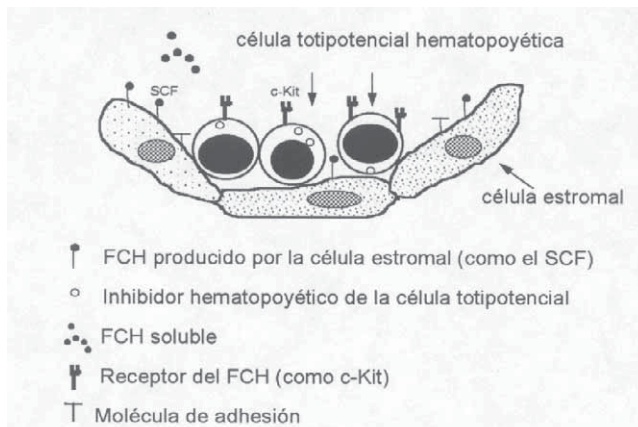


Figura 2. Esquema mostrando la interacción celular entre las células totipotenciales hematopoyéticas y el estroma.

De esta manera se establece una área cubierta por células en forma adoquinada (*cobble-stone area forming cell, CAFC*) la cual es un patrón microscópico detectable que forman las células totipotenciales sobre las células estromales.¹⁵ Recientemente se ha comprobado que existe una alta correlación entre las células capaces de iniciar cultivos a largo plazo (*long-term culture initiating cell, LTC-IC*) con las células que forman CAFC.¹⁶ Las células totipotenciales pueden ser cultivadas tanto en medios líquidos como semisólidos en ausencia del soporte dado por células estromales. Varias combinaciones de citocinas han sido utilizadas en tales cultivos para mantener y promover la proliferación de las células totipotenciales. Pero desafortunadamente, ninguna combinación de citocinas ha sido identificada capaz de promover una expansión significativa o el mantenimiento a largo plazo de las células totipotenciales en tales cultivos. La autorrenovación y la diferenciación de las células totipotenciales no concuerda con lo encontrado *in vivo*.⁸

La célula totipotencial es una célula en reposo con una enorme potencial de proliferación y diferenciación

Las células totipotenciales son escasas, en promedio 1 por cada 10,000 entre las células mononucleares de la médula ósea, y a pesar de ser el origen del sistema celular más proliferativo, permanecen la mayor parte del tiempo sin dividirse. Este estado quiescente o de latencia protege el patrimonio genómico de posibles accidentes durante la división celular. La escasez y la quiescencia han sido dos dificultades importantes en el estudio de estas células.

Observando el sistema equilibrado a que dan lugar las células totipotenciales hematopoyéticas, se podría pensar que están programadas para la diferenciación. Sin embargo, la orientación de la célula totipotencial hacia un linaje determinado parece ser operado al azar, es decir estocástica, según la teoría de Till y McCulloch,⁹ teoría bien detallada por las experiencias de M. Ogawa.¹⁷ Los estudios de M. Ogawa sobre *células blásticas formadoras de colonias*, demostraron que la descendencia de éstas células puede dar lugar a linajes celulares muy diferentes. Por ejemplo, una célula hija da lugar a macrófagos y granulocitos mientras que la otra a megacariocitos y eritrocitos. Inclusive una sola célula, observaron ellos, puede dar lugar a cinco colonias celulares diferentes. Parece difícil creer que un sistema tan ordenado pueda obedecer a las leyes de probabilidad. Morrison y Weissman,⁸ han podido predecir el potencial de autorrenuevo de progenitores multipotentes basándose en la expresión de marcadores de superficie. Para ellos eso habla de un modelo determinístico: el autorrenuevo está determinado por factores intrínsecos. Estas células son poblaciones que representan un *linaje de progenitores multipotentes* constituido por un continuo que va desde las formas más primitivas hasta las más diferenciadas. Pero si la probabilidad es el origen de ciertas opciones durante la diferenciación, la evidencia de regulaciones internas en los progenitores explicaría la homeostasis existente. B. Panterne, ha demostrado un retrocontrol en monocitos maduros sobre sus progenitores.¹⁸ Este retrocontrol se realiza por medio de un factor de crecimiento, el factor estimulante de la formación de colonias de macrófagos (*macrophage colony-*

stimulating factor M-CSF o CSF-1) secretado por los monocitos maduros, que controla negativamente su receptor sobre los precursores mielomonocitarios. Este retrocontrol disminuye la producción de los monocitos en beneficio de los granulocitos. El grupo de A. W. Burgess sugirió la existencia de una jerarquía de los diferentes factores estimuladores de colonias (*colony-stimulating factors* (CSFs)) e interleucinas en el retrocontrol de la expresión de receptores en los progenitores.¹⁹ Este control puede ejercerse sobre el propio receptor de la citocina (*down-regulation*) o sobre el receptor de otra citocina (*down-modulation*). Vemos que, si la teoría estocástica postula un mecanismo aleatorio de la diferenciación, existen sin embargo mecanismos de regulación que actúan sobre los progenitores derivados de ésta célula. Sin embargo, conviene tomar con cautela las diferentes teorías sobre la diferenciación de la célula totipotencial. La interpretación de ciertas experiencias puede ser modificada ulteriormente a la luz de nuevos resultados. Es así como los resultados de algunos experimentos de D. Metcalf, explicados por el autor en términos deterministas,²⁰ pueden actualmente ser reinterpretados por mecanismos de retrocontrol parecidos a los descritos.²¹

Inhibidores internos y externos para controlar la proliferación de la célula totipotencial

Ante la ineficacia de la mayoría de los moduladores biológicos para sacar a la célula totipotencial de la fase de quiescencia Go, se ha buscado la posibilidad de que este estado sea mantenido por inhibidores extracelulares o por factores de control negativo intracelular. Se conocía ya la existencia de algunos inhibidores de la hematopoyesis como el TGF- β (transforming growth factor- β), el MIP-1 α (macrophage inflammatory protein-1a), el factor de necrosis tumoral (TNF), el interferón gama (INF γ)²² e igualmente a los genes supresores de tumores. Desarrollando oligonucleótidos antisentido para los inhibidores y para los genes supresores de tumores, es posible estudiar la función de ciertos genes que mantienen a la célula totipotencial en estado de quiescencia. Esta estrategia permite controlar la salida de la fase Go de células CD34+ CD38 pertenecientes al compartimiento de la célula totipotencial

y permitirles dividirse *in vitro*.²³ En efecto, bloqueando la expresión de inhibidores como el TGF- β o el producto de genes supresores de tumores como el gen Rb (retinoblastoma), se ha logrado activar progenitores más indiferenciados que aquellos cultivados con la más óptima combinación de citocinas. Con ayuda de cultivos de células aisladas provenientes del compartimiento de la célula totipotencial, se ha logrado demostrar que en presencia de oligonucleótidos antisentido de TGF- β se bloquea la producción autócrina de este inhibidor. La célula totipotencial contiene entonces la maquinaria necesaria para mantenerse en estado de quiescencia.²⁴ La estrategia de oligonucleótidos antisentido para los inhibidores o genes supresores, ha permitido igualmente evaluar el potencial hematopoyético de células primitivas con diferentes grados de diferenciación.

L. Terstappen y colaboradores postularon, que el compartimiento de la célula totipotencial está incluido en la subpoblación CD34+ CD38 y que la población de células CD34+ CD38 HLD DR- de la médula ósea fetal contiene una célula totipotencial capaz de diferenciarse no solamente hacia los linajes linfo-mieloides sino que también hacia células estromales (24). 3. Hatzfeld, ha demostrado que las células CD34+ CD38 y no las células CD34+ CD38+ son activadas por el oligonucleótido antisentido de TGF- β ,²³ y que el compartimiento de la célula totipotencial es capaz de producir este inhibidor de la proliferación en lugar de las células estromales.

Movilización, mantenimiento y proliferación de las células totipotenciales hematopoyéticas

El sistema jerárquico de la hematopoyesis es congruente con la acción de factores de crecimiento en diferentes puntos a todo lo largo de la cascada de diferenciación. Un dogma previo sostenía que tanto el G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*), el M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) y la eritropoyetina eran selectivamente activos sobre granulocitos, macrófagos y eritrocitos respectivamente, mientras que el GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), interleucina-1 (IL-1), IL-3, e IL-6 actuaban sobre células totipotenciales multipotentes. Aunque esta

aseveración puede ser cierta, recientes datos demuestran que muchos factores de crecimiento actúan en varios puntos durante la diferenciación.

La utilización de citocinas en el ser humano como G-CSF, GM-CSF y el factor de la célula totipotencial (*Stem Cell Factor*; SCF) o factor Steel (*Steel factor*, SF) induce la movilización de células CD34+ de médula ósea hacia la sangre periférica.²⁵ Ellas pueden ser recobradas por nuevas técnicas de enriquecimiento para dicha población y mantenidas *in vitro*, en presencia de cócteles de citocinas. Por otra parte, a diferencia de lo que ocurre *in vivo*, las células CD34+ cultivadas *in vitro* en presencia de GM-CSF tienden a diferenciarse. Surge la pregunta, ¿es posible mantener las células CD34+ en proliferación *in vitro* sin diferenciarse? Recientes observaciones^{26,27} indican que el SCF inhibe la apoptosis o muerte celular programada de las células hematopoyéticas y que puede mantener vivas las células CD34+ sin inducir diferenciación y expandirlas con la coestimulación de interleucina-1 β (IL-1 β), ILd-3, IL-6 y eritropoyetina (EpO).²⁵ Para la realización de estudios en trasplante, la utilización del SCF podría ser vital en el mantenimiento de estas células *ex vivo* en un estado no diferenciado.^{26,27} En la actualidad es cada vez más usado el trasplante de sangre periférica con células totipotenciales movilizadas, en comparación con el trasplante de médula ósea, dado sus más bajos costos y su más fácil manejo. Por otra parte, es sabido que la sangre periférica contiene *per se* progenitores CD34+ CD33+ circulantes diferentes a las células pluripotenciales CD34+ CD33 de médula ósea, observándose una diferenciación inicial. La utilización de citocinas para movilizar progenitores hematopoyéticos más primitivos a la sangre periférica garantiza que se encuentren en mayor proporción.

En relación a la capacidad de ciertas citocinas de influir en el estado de diferenciación de las células totipotenciales hematopoyéticas, se cree que la expresión coordinada de genes linaje específico en las células hematopoyéticas en proliferación está mediado en parte por la activación o supresión de factores de transcripción. El transactivador GATA-1 es un ejemplo de ellos que se encuentra restringido a los linajes eritroide, megacariocítico y de células cebadas.²⁸ Es posible que *in vitro* el SCF no active los factores de trans-

cripción necesarios para la diferenciación de células CD34+ y en cambio el GM-CSF induzca la activación de estos factores.

El cordón umbilical: alternativa en el trasplante sanguíneo

Con más frecuencia la sangre de cordón umbilical es más utilizada para ser trasplantada en niños. Sin embargo, es importante conocer también las condiciones de trasplante de sangre de cordón umbilical a un adulto. Se han hecho estudios comparativos²³ entre el potencial hematopoyético de la sangre de cordón umbilical y el potencial de médula ósea. En esos estudios las células purificadas CD34+ CD38 de sangre de cordón y de la médula ósea, proliferaron en medio líquido a largo plazo bloqueando la producción autócrina de TGF- β para permitir un máximo desarrollo del compartimiento de la célula totipotencial. Este desarrollo fue evaluado cada semana tomando una alícuota del cultivo y sembrándola en cultivos semisólidos secundarios con el fin de determinar la producción de los diferentes progenitores. Luego de siete semanas de cultivo en líquido, la producción total de diferentes tipos de progenitores (BFU-E: *burst forming unit erythroid*; CFU-GM: *colony forming unit-granulo-monocytes*) en la sangre de cordón se reveló significativamente superior comparada con la de médula ósea.²⁹

Debido al grado de eficiencia en la reconstitución de la hematopoyesis, su bajo grado de rechazo contra injerto y su superior potencial comparado con el de médula ósea hacen del cordón umbilical una buena alternativa en el trasplante sanguíneo en malignidades hematológicas y no hematológicas.

Perspectivas y conclusiones

Los resultados antes expuestos aportan una prueba suplementaria: el compartimiento de la célula totipotencial está constituido por células heterogéneas teniendo potenciales hematopoyéticos diferentes. Sin duda alguna en el futuro será necesario definir las subpoblaciones de células totipotenciales, como se han definido las subpoblaciones de las células T o de macrófagos.

Actualmente, uno de los objetivos es obtener células totipotenciales que permitan crear fácilmente almacenes de ellas. La sangre proveniente de cordón umbilical se ha revelado como una buena alternativa para la creación de estos bancos de células totipotenciales. Las ventajas de la sangre de cordón umbilical es su disponibilidad en México y su más fácil obtención a diferencia de la médula ósea. Pero aún quedan problemas por resolver: (a) ¿será necesario congelar bolsas de sangre de cordón o podremos hacer bancos de células totipotenciales CD34+ y que puedan ser congeladas en viales de 1.5 ml?; (b) ¿será necesario transplantar las células totipotenciales purificadas con ciertas subpoblaciones celulares que favorezcan la destrucción de células malignas (fenómeno de *graft versus leukemia* o GVL) sin provocar el fenómeno de rechazo contra injerto *graft versus host* o GVH?; (c) ¿se podrá activar solamente una parte de las células totipotenciales o asociarlas a progenitores más maduros para acelerar el éxito del trasplante? ¿Cuál será el papel de las citocinas en éste caso?; (d) además dentro de las finalidades de muchos proyectos de investigación, la célula totipotencial es una candidata de opción para la terapia génica de las enfermedades genéticas, el cáncer y el SIDA; en estos casos ¿se podrán sacar de la fase Go las células totipotenciales purificadas, activarías para practicar la transferencia del gen, y después regresarlas a la fase de quiescencia para impedir que se diferencien?

En la última década, se comenzó a estudiar la posibilidad de purificar la célula totipotencial para utilizarla con fines clínicos, comprendida la terapia génica, y el proyecto parecía utópico para muchos. Ahora, esos proyectos se han convertido en una realidad en numerosos centros de trasplantación. Es probable que, en los próximos años, la realidad rebase a los viejos mitos subyacentes de la célula totipotencial.

Referencias

1. **Orkin SH.** Hematopoiesis: How does it happen? *Curr Opin Cell Biol* 1995;7:870-877.
2. **Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Bucide AM, Peault B.** Isolation of a candidate human hematopoietic stem cell population. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:2804-2808.

3. **Robinson BE, Quensenberry PJ.** Hematopoietic growth factors. Part f. *Amer J Med Sci* 1990c;300:311-321.
4. **Robinson BE, Quensenberry PJ.** Hematopoietic growth factors. Part 1. *Amer J Med Sci* 1990a;300: 163-70.
5. **Robinson BE, Quensenberry PJ.** Hematopoietic growth factors. Part II. *Amer J Med Sci* 1990b;300:237-44.
6. **Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN.** The kit ligand, *Stem Cell Factor*. *Adv Immunol* 1994;55: 1-95.
7. **Brugger W, Heimfeld S, Berenson RJ, Mertelsmann R, Kanz L.** Reconstitution of hemopoiesis after high-dose chemotherapy by autologous progenitor cells generated ex vivo. *N Eng J Med* 1995;333:283-287.
8. **Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL.** The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Dev Biol* 1995;11:35-71.
9. **Tul JE, McCulloch EA, Siminovitch L.** A stochastic model of stem cell proliferation based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1964;51:29-36.
10. **Jones U, Wagner JE, Celano P, Zicha MS, Sharkis SJ.** Separation of pluripotent hematiopoietic stem cells from spleen colony forming cells. *Nature* 1990; 347:1538-1543.
11. **Morrison SJ, Weissman IL.** The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1994; 1:661-673.
12. **Spangrude GJ, Johnson GR.** Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87:7433-7437.
13. **Cáceres-Cortés JR.** El Factor Steel. *Rev Invest Clin* 1997; 49:507-514.
14. **Dexter TM, Moore MAS, Sheridan APC.** Maintenance of hemopoietic stem cells and production of differentiated progeny in allogeneic and semiallogeneic bone marrow quimeras in vitro. *J. Exp. Med.* 1977;145: 1612-1616.
15. **Ploemacher RE, Van der Sluijs JP, Van Beurden CAJ, Baert MRM, Chan PL.** Use of limiting-dilution type long-term marrow cultures in frequency analysis of marrow-repopulating and spleen colony-forming hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 1991;78:2527-2533.
16. **Reading C, Tricot G, Dietz I, Schwartz D, Young J., Chen S, Chen B, Feng L, Brown W, Hoffman R.** Evaluation of in vitro and in vivo assays of human hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 1994;22:786 (Abstr.)
17. **Ogawa M.** Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 51:29-36.
18. **Panterne B, Zhou YQ, Hatzfeld J, Li ML, Lévesque JD, Clark SC, Hatzfeld A.** CSF-1 control of c-fms expression in normal human bone marrow progenitors. *J Cell Physiol* 1993; 155:282-289.
19. **Walker F, Nicola A, Metcalf D, Burgess AW.** Hierarchical down-modulation of hemopoietic growth factor receptors. *Cell* 1985;43:269-276.
20. **Metcalf D.** Clonal analysis of proliferation and differentiation of paired daughter cells: action of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on granulocyte-macrophage precursors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:5327-5330.
21. **Panterne B, Hatzfeld A, Zhou YQ, Li ML, Sansilvestri P, Cardoso A, Levesque JP, Ginsbourg M, Bat&d P, Kiselev S, Hatzfeld J.** Contrôles positifs et négatifs du développement des progéniteurs hématopoïétiques: modèles et faits. *Nouv Rev Fr Hematol* 1993;35:281-283.
22. **Guigon M, Lemoine F, Dainiak N, Schechter A, Najman A.** The negative regulation of hematopoiesis: from fundamental aspects to clinical applications. Paris: Inserm John Libbey Eurotex, 1993; 229.
23. **Hatzfeld J, Li ML, Brown EL, Sookdeo H, Lévesque J-P, O'Toole T, Gurney C, Clark SC, Hatzfeld A.** Release of early hematopoietic progenitors from quiescence by antisense transforming growth factor by or Rb oligonucleotides. *J Exp Med* 1991;174:925-929.
24. **Huang S, Terstappen LWMN.** Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single bone marrow stem cells. *Nature* 1992;360:745-749.
25. **Sandstrom CE, Bender JG, Papoutsakis ET, Miller WM.** Effects of CD34+ cell selection and perfusion on ex vivo expansion of peripheral blood mononuclear cells. *Blood* 1995;86:958-970.
26. **Cáceres-Cortés JR, Rajotte D, Dumouchel J, Haddad P, Hoang T.** Product of the Steel locus suppresses apoptosis in hemopoietic cells. Comparison with pathways activated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J Biol Chem* 1994;269:12084-12091.
27. **Cáceres-Cortés JR, Santiago Osorio E, Monroy García A, Mora García ML, Weiss Steider B.** El stem cello factor (SCF) sostiene la sobrevivencia de progenitores de granulocitos en cultivos de médula ósea de ratón. *Rev Invest Clin* 1999; 51:107-116.
28. **Shivdasani RA, Orkin SH.** The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* 1996;87:4025-4039.
29. **Cardoso AA, Li ML, Batard P, Hatzfeld A, Brown EL, Lévesque JP, Hatzfeld J.** Release from quiescence of CD34+ CD38- human umbilical cord blood reveals their potentiality to engraft adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:8707-8711.