

USO TERAPÉUTICO E INVESTIGACIÓN CON CÉLULAS TRONCALES HUMANAS: RACIONALIDAD CIENTÍFICA

Natalia López Moratalla.

*Departamento Interfacultativo de Bioquímica y Biología Molecular.
Facultad de Medicina. Universidad de Navarra. 31080 Pamplona
natalialm@unav.es*

Resumen

La Medicina regenerativa (basada en el implante de células inmaduras, o en la fusión de éstas con las células dañadas, o en el aporte de los factores que permitan la regeneración celular) supone abrir una nueva vía terapéutica. Desde sus inicios esta área tiene planteada una tensa problemática por el planteamiento, en su origen mismo a finales de 1998, de utilizar embriones humanos preimplantatorios como fuente de células troncales embrionarias. Inmediatamente después se conoció la «plasticidad» de las reservas de células indiferenciadas del organismo adulto y que éstas podrían aportar una regeneración de los tejidos afectados en el propio organismo y con sus propias armas. Claramente, era y sigue siendo, imprescindible valorar rigurosamente tanto la posibilidad de controlar el potencial de las células troncales derivadas de embriones que se transforman en tumores, así como valorar la plasticidad de las células troncales de adulto para su potencial uso terapéutico. Una valoración que exige una investigación con resultados positivos previos en modelos animales. Pero, en todo caso, hay que tener en cuenta que no estamos ante dos tipos celulares troncales similares; una cuestión previa a cualquier debate es la racionalidad científica que plantea para un mismo uso terapéutico dos realidades diferentes. Este punto se analiza aquí más extensamente. Nunca es lícito destruir para usar como «fármaco», o para investigar, una sola vida humana por mucho beneficio que acarrear a terceros. Y al tiempo, no se debe frenar la búsqueda de conocimientos porque una investigación biomédica que se dirige a curar enfermos es una obligación

moral. Se exige por tanto que se cumplan plenamente todos los requisitos éticos (y legales) propios de la investigación científica biomédica y clínica. La ética de la investigación tiene principios sólidos de rigor, objetividad y aceptar el juicio de expertos. Se requiere dar razón de la coherencia racional de sus afirmaciones; sólo así se podrá encauzar la investigación sin ambivalencias ni técnicas, ni éticas y con una gran prudencia que permita al científico trabajar sin crear falsas expectativas a los enfermos. Tres cuestiones son esenciales: a) Las células troncales de embriones y las de adulto son dos realidades biológicas diferentes y estas últimas ocupan el lugar terapéutico mientras que las derivadas de embriones no compiten con ellas; b) La racionalidad científica exige explorar y aplicar la capacidad de las células troncales de adulto en la terapia regenerativa dependiente además del tipo de enfermedad; c) en caso de que se diera la situación, no previsible, de una necesidad ineludible de células troncales embrionarias, como material de partida para investigación, habría que proseguir los trabajos destinados a lograr estos tipos celulares sin acudir a embriones como fuente.

Palabras clave: Célula troncal de embriones; célula troncal de adulto; terapia regenerativa; reversión de la diferenciación.

Abstract

Regenerative medicine (based on the implantation of immature cells, the fusion of these cells with damaged ones, or on the contribution of the factors that permit cellular regeneration) implies opening a new therapeutic method. From its beginnings in 1998, this process has been complex because of the manner in which it has used preimplantation human embryos as the main source of stem cells. Soon after, however, scientists learned of the flexibility of the reserves of undefined stem cells in the adult organism and that these could contribute to a regeneration of its own damaged tissues with its own arms. Clearly, it is imperative to rigorously evaluate the possibility of controlling the potential of stem cells derived from embryos that are transformed into tumors, as well as measure the flexibility of adult stem cells for therapeutic use. This examination requires extensive previous positive results in animal experimentation. Nonetheless, in any case, we must not forget that we are not considering two similar types of stem cells. A central question to any debate on this issue involves the scientific rationality of using two different types of cells for the same therapeutic use. This issue will be discussed in more detail.

It is never licit to destroy human life for «medicine» or for research, no matter how beneficial it is to third parties. At the same time, we should not hinder scientific progress, because biomedical research has the moral obligation of curing patients. We should demand, therefore, that all the ethical and legal requirements of biomedical and clinical research be fulfilled. The ethics of research has solid principles of rigor, objectivity, and to accept the judgement of experts. We are required to explain the

rational coherence of our affirmations. Only then can we lead the clearly defined and explained research, partly to avoid creating false expectations in the patients. There are three fundamental questions that must be considered: a) embryonic and adult stem cells are two distinct biological realities and the latter have a therapeutic function that the former cannot compete with; b) scientific reason demands that we explore and apply the capacity of adult stem cells in regenerative therapy depending on the specific type of illness we are dealing with; c) if it is absolutely necessary to use embryonic stem cells for research, we will be required to begin studying how to obtain those stem cells without destroying embryos in the process.

Key words: adult stem cells, embryonic stem cells, regenerative medicine.

1. El contexto en que se inicia la Medicina regenerativa

La investigación en Medicina regenerativa, y de sus aplicaciones terapéuticas, busca conocer la capacidad de las células troncales de proliferar, diferenciarse y suplir aquellas células que se han destruido a causa de enfermedad o accidentes; busca también conocer la capacidad de estas células de aportar los factores necesarios para una nueva génesis celular *in vivo*. El empleo de estas células en la terapia de enfermedades, especialmente las degenerativas, como vehículo de factores para reactivar células afectadas, la posibilidad de fundirse con la célula alterada y «rejuvenecerla», e incluso de convertirse en una células diferenciada igual a la degenerada y sustituirla *in vivo*, supone abrir una nueva vía terapéutica, en principio con un gran porvenir. Y, por ello, la perspectiva de utilizar estas células para generar otros tipos celulares, incluso tejidos, para su posterior aplicación terapéutica, ha sido un poderoso estímulo del interés de científicos y del público en general.

Desde sus inicios esta área tiene planteada una tensa problemática. El planteamiento, en su origen mismo a finales de 1998, de utilizar embriones humanos precoces, en principio sobrantes de las prácticas de FIV, o creados a ese fin, como fuente de células troncales embrionarias, y el inmediato conocimiento de que la «plasticidad» de las reservas de células indiferenciadas podría aportar una regeneración de los tejidos afectados en el propio organismo y con sus propias armas, creo la disyuntiva: «células madre de adulto frente a las células madre embrionarias». En efecto, las células troncales embrionarias, que se obtuvieron de la masa celular interna de blastocistos, son inherentemente primitivas, pueden proliferar indefinidamente, y tienen la capacidad de generar todos los tipos celulares del adulto. También desde el inicio, muchos investigadores razonaron que las células derivadas de un organismo adulto tienen suficiente potencial de desarrollo y sería un sustituto eficaz de las células embrionarias en situaciones terapéuticas, sin ninguna pérdida apreciable de eficacia regenerativa. Otros mantuvieron

que no estaba suficientemente demostrado todavía que las células troncales de adulto poseyeran una capacidad amplia para diferenciarse y que su proliferación, más limitada que la de las células troncales embrionarias, las haría incapaces de aportar una fuente de células progenitoras, para reemplazar el tejido perdido en una enfermedad crónica.

Claramente, era y sigue siendo, cinco años después, imprescindible valorar rigurosamente tanto la posibilidad de controlar células que como las troncales derivadas de embriones son tan absolutamente indiferenciadas, así como valorar la plasticidad de las células troncales de adulto para su potencial uso terapéutico. Una valoración que exige una investigación con resultados positivos previos en modelos animales. Pero, en todo caso, hay que tener en cuenta que no estamos ante dos tipos celulares troncales similares, ni el problema es sólo proceden de embriones o de sangre de donante o del propio organismo del enfermo; una cuestión previa a cualquier debate es la racionalidad científica que plantea para un mismo uso terapéutico dos realidades diferentes. Es este el punto que analizaremos aquí más extensamente.

Por otra parte, el hecho de que el hombre sea sujeto-objeto de esas investigaciones, y potencial beneficiario de las aplicaciones centran el trabajo científico en un clima de una evidente responsabilidad ética. Esto no debe frenar la búsqueda de conocimientos porque una investigación biomédica que se dirige a curar enfermos es una obligación moral. Por el contrario, exige del científico bio-

médico un esfuerzo adicional para saber con seguridad que la forma de obtener esos conocimientos y la racionalidad de sus aplicaciones terapéuticas, no conlleven de partida producir y manipular vidas humanas, destruir, mutilar o dañar, la vida de embriones preimplantarios «biológicamente» humanos, aún en el caso de que dude o crea que no son personas humanas. La fuente de partida de las células humanas, tanto para investigar como para usarlas en terapia, no es un asunto de neutralidad de la ciencia. La primera palabra al respecto es de la ciencia; pero la segunda inmediata es de la sociedad que debe exigir que se cumplan plenamente todos los requisitos éticos (y legales) propios de la investigación científica biomédica y clínica.

La manipulación técnica que requiere la obtención de las células troncales embrionarias necesariamente remite a la cuestión del valor en sí mismo de un ser humano en su fase previa a la implantación en el útero materno. Creencias, increencias, e ideologías, de un lado, conceden un valor bien absoluto, o bien relativo (aunque siempre alto) a una vida humana por objetivamente precaria que sea su situación. De otro, interés político-ideológicos y económicos, y los medios de comunicación, presionan ilegítimamente en la ponderación que la ciencia ha de hacer cuando está abriéndose paso una nueva área de conocimiento de una relevancia que se supone será inusitada para la biomedicina. Es difícil saber que significa «respeto especial» hacia los embriones en el contexto de la investigación en este campo. Y es muy fácil tildar de

«freno del progreso» todo argumento que intente delimitar cual es el respeto especial al embrión y en que se diferencia del respeto debido a todo ser humano.

Las cuestiones éticas de este campo han dividido tanto a científicos, como a políticos y a la sociedad misma. Y además, el estudio y la divulgación, para quien no es especialista en este campo de investigación, se hace particularmente exigente y arduo por el hecho de que algunas revistas científicas, de prestigio e impacto, han tomado una postura previa acerca del posible potencial terapéutico de algunos de los tipos de células troncales. Este es un factor nuevo en la política científica de las revistas especializadas: silenciamiento, desconfianza y descrédito de las investigaciones con células de adulto y lanzamiento orquestado de cualquier dato en la línea de la obtención y de los beneficios derivados de las células troncales sacadas de los embriones humanos.

De ahí la responsabilidad de la comunidad científica de apertura a nuevos datos y profundización del conocimiento como condición de racionalidad. La ética de la investigación tiene principios sólidos de rigor, objetividad, sometimiento al juicio de expertos en la comunicación y difusión de los conocimientos, etc. Como toda actividad humana la tarea de interpretación y discusión de unos datos pueden ser manipulados por convicciones particulares; y es importante que la ciencia pueda de hecho quedar a salvo. Por eso requiere dar razón de la coherencia racional de sus afirmaciones; sólo así se podrá encauzar la investigación sin

ambivalencias ni técnicas, ni éticas. En los campos brillantes y competitivos el afán de protagonismo lleva con frecuencia a imprudencias intolerables en la ciencia. La ciencia tiene que justificar racionalmente qué investiga y por qué investiga de ese modo para alcanzar el objetivo. Los fines terapéuticos dan siempre *a priori* una justificación al objetivo pero no es todo; tampoco puede ser suficiente que «hay dinero» para hacerlo. Lo que existe es prioridades y sobre todo métodos de muy diferente calado ético. No se puede, no se debe, cambiar las reglas de juego de la ciencia, que imponen el respeto a la integridad y dignidad humana, por otros intereses.

2. Las células troncales de embriones y las de adulto son dos realidades biológicas diferentes

En primer lugar, conocemos que los tejidos y órganos del cuerpo humano tienen capacidad, por sí mismos, para reparar los daños y regenerarse: durante la constitución del organismo se guardan reservas de células madre y cuando por lesión o mal funcionamiento es preciso sustituir algunas células hay mecanismos precisos para inducir la maduración de las células troncales en reserva de forma natural. La función de los diferentes tipos de células madre del organismo ya formado (células troncales de adulto) es propia y específica y los factores que inducen su multiplicación y su maduración a células especializadas, en el organismo *in vivo*, se ajustan estrictamente. Conocemos que existen diversos los me-

canismos autónomos de regeneración: transdiferenciación, diferenciación simple, fusión con la célula alterada, y aporte de factores de crecimiento y maduración para las reserva de células troncales del órgano concreto. Por ello, aunque la investigación biomédica debe alcanzar un conocimiento preciso de qué mecanismo usan los diferentes tipos celulares con capacidad de regenerar el daño, no es imprescindible saberlo para iniciar terapias siguiendo rigurosamente los ensayos en las correspondientes fases clínicas, si se ha comprobado en modelos animales que corrigen el daño, o aminora los efectos nocivos de la lesión, sin producir efectos adversos colaterales. En este sentido, es conveniente recordar que, por ejemplo, se llevan ya décadas de trasplantes autónomos y heterólogos de células de la médula ósea, con gran eficacia terapéutica sin que aún sepamos el mecanismo preciso de su funcionalidad y recolocación en su sitio propio.

En segundo lugar, actualmente conocemos con mayor precisión cómo son los primeros días, las primeras etapas, del desarrollo embrionario. Así podemos definir qué es un embrión humano de pocas células, y lo que es un simple conjunto de células, organizado en diversas estructuras multicelulares, sin constituir un organismo. La masa celular interna del embrión de unos cinco días la forma las células troncales embrionarias de las que parten todos los sistemas, tejidos y órganos de un individuo. Las células de este conjunto celular (la masa interna del blastocisto) están organizadas y se influyen mutuamente en tanto en cuanto es-

tas células esta formando la unidad funcional vital de un organismo. Precisamente porque se conoce la información que aporta a cada célula el hecho de estar formando parte de esa unidad que es un cuerpo vivo en sus diferentes fases temporales, tenemos la posibilidad de cambiarles su trayectoria funcional para producir *in vitro* diversos tipos celulares, que –teóricamente– podrían ser implantadas en el paciente y sustituir la función de células dañadas por la enfermedad, o la lesión.

Esos dos conocimientos nos permiten comprender el significado biológico y la función natural y propia de las células troncales de adulto y de las de embriones. Tal realidad biológica es bien diferente y por ello las terapias que puedan derivarse del uso de unas u otras no es simplemente opcional desde el punto de vista médico. En el caso de las células de adulto se trata de inducir y potenciar, en la medida de lo posible *in vivo*, la función que ya naturalmente poseen. Se denomina plasticidad a la capacidad de células troncales específicas de un tejido para adquirir el destino de tipos celulares distintos de los de su origen. El cambio es lento y no en todas ellas la plasticidad es el resultado de una sola célula troncal que se diferencia en más de una línea. Es lógico que a medida que el organismo crece y madura disminuya la necesidad de restringir el potencial de diferenciación; las células troncales guardadas en diferentes tejidos pueden estar aisladas espacialmente en nichos, donde no están expuestas a señales inductivas, presentes en otros tejidos, precisamente

por la organización espacial¹. Son por tanto estas células de adulto², células *multi-potenciales* capaces *in vivo* de regenerar su propio tejido u otro; y capaces, cultivadas *in vitro*, de diferenciarse a células cuyo origen está en una capa embrionaria diferente. Por el contrario, todo posible uso terapéutico de las células embrionarias supondrá sacarlas de su contexto natural –un embrión en desarrollo– crecerlas, madurarlas y transferirlas al enfermo. Incluso si se pudieran obviar los graves problemas éticos de producción y uso de embriones como mero medio en procesos terapéuticos, la agresividad en sí de tales procesos los hace insolventes médicamente por desproporción de los riesgos.

3. Control del crecimiento, diferenciación y muerte programada de las células troncales

El uso terapéutico de las células troncales, o incluso progenitoras requiere, como condición esencial, que por la manipulación no pierdan el control natural, que toda célula de un organismo pluricelular tiene, de su proliferación, maduración y muerte. Este control depende del estado de la célula según el tiempo de desarrollo y del sitio que ocupa en el organismo. En efecto, cada tipo recibe diferentes señales de las células vecinas, y

las interpreta e integra según su historia previa como parte de un organismo. Esta integración de señales externas según su situación y estado, permite que cada célula –según su historia– controle de forma precisa si le corresponde multiplicarse, o madurar o inducir la muerte celular programada; es un equilibrio delicado cuya rotura tiene serias consecuencia en el funcionamiento y capacidad regenerativa.

Las células troncales son células indiferenciadas y por ello con capacidad de proliferación más o menos prolongada para dar células en el mismo estado de indiferenciación y potencial de formar otros tipos diferenciados. Entre los mecanismos de regulación de este equilibrio entre los procesos de crecimiento, maduración y muerte destacan los siguientes: a) nivel de expresión del gen Oct-4 que frena la diferenciación manteniendo el estado pluripotencial de la célula; b) el nivel de la enzima telomerasa que elimina el control de la proliferación celular permitiendo un estado «inmortalizado» de la célula; c) el control de la expresión de genes cuyos productos bloquean y desbloquean el estado de inmadurez de la célula.

Esto implica que las cascadas de expresión de genes que permiten y regulan los tres procesos celulares clave para la vida de un organismo (proliferación, apoptosis y diferenciación) están estrechamente interconectados. Es un aspecto esencial para su uso terapéutico potencial. De una parte, la combinación de las influencias del entorno y el cambio en los niveles de expresión de unos pocos

1 Spradling A, Drummond-barbosa D, Kai T (2001) Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98-104.

2 Tsai RVL, Kittappa R, McKay RDG (2002) Plasticity, niches, and the use of stem cells. *Develop Cell* 2, 707-712.

genes reguladores puede instar a células madre, más o menos comprometidas hacia un linaje, hacia un rango mucho más amplio de potenciales de desarrollo, y así aumentar, en el futuro, la eficacia de las terapias regenerativas con células madre. Y por otro las alteraciones de la regulación de ese delicado equilibrio celular están en la base de la transformación cancerosa.

4. Células troncales de adulto

En los tejidos de organismos adultos existen células troncales³, responsables de mantener los tejidos en condiciones fisiológicas y además de repararlos en caso de alteración o daño, además de las ampliamente conocidas hematopoyéticas de la médula ósea (HSC) y la sangre. En octubre de 2003 Linda Demer describió un, actualmente último tipo, de célula troncal como una subpoblación de células vasculares las calcificantes (CVC) que derivó clonalmente de células de la capa media de la aorta bovina y capaces de

diferenciación osteoblástica y mineralización y otros linajes mesenquimatosos⁴.

Las células troncales de adulto presentan capacidad de autorenovación y de generar varios tipos de progenie diferenciada⁵. Sustituido por otro su entorno natural, ejecutan el programa de diferenciación intrínseco de la célula de acuerdo con las nuevas señales de diferenciación que recibe. El paradigma de que las células troncales de adulto tienen restringida su potencialidad ha cedido actualmente ante la evidencia creciente de que éstas células contribuyen a otros tipos celulares cuando están expuestas a las influencias del entorno apropiadas⁶. Inicialmente se pensó que el aislamiento y el cultivo de células troncales de tejidos adultos tendrían serias limitaciones técnicas en el ser humano, puesto que el uso terapéutico estaría ligado estrechamente a la posibilidad práctica de multiplicarlas *in vitro* en un modo eficiente. Sin embargo, por una parte, existe una gran reserva de células con carácter pluripotencial en la médula ósea con esa función precisamen-

3 Algunas revisiones de interes: Clarke D, Frisen J (2001) Differentiation potential of adult stem cells. *Current Opinion in Genetics & Development* 11, 575-580; Körbling M, Zee Estriv (2003) Adult stem cells for tissue repair. A new therapeutic concept? *N. Eng. J. of Med.* 349, 570-580; Blau H M, Brazelton T R, Weimann J M (2001) The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*, 105, 829-841; Wulf G G, Jackson K A, Goodell MA (2001) Somatic stem cell plasticity: current evidence and emerging concepts. *Exp Hematol*, 29, 1361-1370; Lachmann P, (2001) Stem cell research—why is it regarded as a threat? *EMBO Rep*, 2, 165-168. Verfaillie C M, Pera M F, Lansdorp P M (2002) Stem cells: hype and reality. *Hematology*, 369-389.

4 Tintut Y, Alfonso Z, Saini T et al. (2003) Multilineage Potential of cells from the artery wall. *Circulation* 108, 2505-2510.

5 Morrison SJ, Shah NM, Anderson DJ (1997) Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88, 287-298; Watt FM, Hogan BLM (2000) Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 287, 1427-1430.

6 Cfr. entre otras: Clarke DL, Johansson CB, Wilbertz J et al. (2000) Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 288, 1660-1663; Zuleswki H, Abraham EJ, Gerlach MJ et al. (2001) Multipotential nestin-positive stem cells isolated from adult pancreatic islets differentiate ex vivo into pancreatic endocrine, exocrine, and hepatic phenotypes. *Diabetes* 50, 521-33.

te. Estas células pueden utilizarse de forma autóloga, crecen, y su injerto no genera tumores. Son, por tanto, el tipo de célula madre que posee, en principio, las mejores características para la terapia celular.

Se ha descrito otra fuente abundante de células madre de adulto con gran plasticidad, que es la grasa⁷; las células troncales del tejido adiposo, obtenidas del material de la liposucción, son capaces de diferenciarse *in vitro* y dar músculo, hueso y cartílago, e incluso células nerviosas⁸, y cardiomiocitos. Y por otro lado, la médula ósea contiene células troncales HSC, mesenquimales (MSC) y células progenitoras endoteliales. Se ha identificado un tipo de célula madre en la médula ósea murina y de rata (MAPC) *pluripotente in vitro*, y por tanto equivalente a una célula embrionaria en cuanto a potencialidad⁹; estas células presentan, como ellas, alto nivel de Oct-4 y marcadores de células inmaduras. Las humanas son capaces también de un extenso crecimiento *in vivo* e *in vitro* y se diferen-

cian a células de los diferentes tejidos¹⁰. Por otra parte las células troncales mesenquimatosas expresan suficiente cantidad de telomerasa para mantener los telómeros con una longitud constante, lo que hace posible una alta multiplicación; con la seguridad de que esta expresión no alcanza los niveles elevados típicos de las células troncales embrionarias o las células tumorales.

Varios fenómenos están en el origen de la plasticidad de las células madre de adulto; las células troncales multi o pluripotentes persisten en la vida postnatal y hay precursores definidos de células troncales somáticas que persisten mas allá de los primeros estadios de la embriogénesis; las específicas de tejidos están presentes en distintos órganos. Esta bien establecido el hecho de que las células troncales hematopoyéticas salen del espacio de la médula ósea, circulan por la sangre periférica y llegan a distintos órganos y por ello se encontraran en otros tejidos diferentes; también sufren desdiferenciación y rediferenciación. Y algunas de ellas, como las HSC, cumplen los criterios que se establecieron para definir las células troncales embrionarias: a) sufren unas divisiones múltiples y secuenciales renovadoras, un requisito para el mantenimiento de la población; b) las células hijas que provienen de una sola célula madre se diferencian en más de un tipo celular; c) pueden repoblar el tejido de ori-

7 Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. (2001) Multilineage Cells from Human Adipose Tissue: Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Eng.* 7, 211-228.

8 Safford KM, Hicok KC, Rice H, Safford SD, Halvorsen YDC, Wilkison WO, Gimble JM, Rice HE (2002) Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys. Res. Comm.* 294, 371-379.

9 Jiang Y, Jahagirdar BN, Reinhardt RE, Schwartz LR, Keene CD, Ortiz-Gonzalez XR, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low WC, Largaespada DA, Verfaillie CM (2002) Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 20 de junio de 2002. Online/nature 00870.

10 Reyes M, Lund T, Lenvik T, Aguiar DK die L, Verfaillie CM (2001) Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 98, 2615-25.

gen cuando son transplantadas en un tejido dañado.

Las células de los tejidos de adulto mantienen un número correcto de células tanto por *turnover* diferenciándose a partir de células troncales, como por duplicación de las diferenciadas existentes. Por ejemplo, las células productoras de insulina en el páncreas adulto derivadas de las células troncales de este tejido, parece que pueden surgir en gran parte de las mismas célula beta preexistente aportando una visión nueva a la medicina degenerativa: las diferenciales terminales beta retienen una significativa capacidad de proliferan in vivo¹¹.

4.1. Uso racional de la capacidad de las células troncales de adulto en la terapia regenerativa

El procedimiento de uso, la fuente de obtención y las características de las células troncales o progenitoras que se puedan emplear con finalidad terapéutica, obviamente dependen en primer lugar de la enfermedad a tratar: de la causa de la destrucción de células concretas y de la complejidad interna del órgano a reparar. Es lógico que el abordaje de la terapia regenerativa parta fundamentalmente y se apoye en la función natural, bien estudiada, de las células troncales hematopoyéticas (HSC) de la médula ósea, donde de manera continua vuelven a rehacer las células diferenciadas de la sangre periférica que se pierden con el desgaste o agotamiento natural; poseen,

11 Dor Y, Brown J, Martinez OI and Melton D (2004) *Nature* 429, 41-46.

por tanto, una ventaja «estratégica» importante sobre otras células troncales: están bien definidas, son fáciles de aislar, y pueden inyectarse, con lo que llegan a otros tejidos a través de la circulación sanguínea. Más aún, el transplante de la médula ósea o células madre hematopoiéticas conduce a la inducción de tolerancia del donante.

Diversos estudios en modelos animales aportan apoyo a la función regeneradora del transplante de células troncales hematopoiéticas; así, el transplante de estas células de ratones macho en hembras *mdx*, un modelo de la distrofia muscular de Duchenne¹², ha sido eficaz aunque no fue posible valorar la contribución de las células injertadas en la función cardíaca o en la fuerza del músculo. Y la inyección de un número muy pequeño de células troncales hematopoiéticas en ratones con una enfermedad letal del hígado se pudo repoblar el sistema hematopoiético y transdiferenciarse a hepatocitos corrigiendo fallo hepático¹³.

Además de la experimentación animal, se han realizado observaciones de interés en pacientes; por ejemplo, se han examinado los hígados de pacientes que recibieron médula ósea de un donante del sexo opuesto o un transplante hepático y en ambos casos han encontrado

12 Gussoni E, Soneoka Y, Strickland C D, Buzney E A, Khan M K, Flint A F, et al. (1999) Dystrophin expression in the *mdx* mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*, 401, 390-394.

13 Lagasse E, Connors H, Al-Dhalimy M et al. (2000) Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nat Med* 6, 1229-1234.

hepatocitos y colangiocitos del sexo opuesto, lo que sugiere que una célula madre de la médula ósea en circulación por la sangre podría haber anidado en el hígado y allí haberse transdiferenciado¹⁴. Otros han dado a conocer implantes de osteoblastos de donantes y una potenciación de formación de hueso después de un trasplante de médula ósea en niños con la forma más grave de osteogénesis imperfecta, una alteración genética de la producción de colágeno¹⁵; se puede concluir que las células progenitoras mesenquimatosas que residen en el compartimento de la médula ósea fueron responsables de los cambios, aunque parte del efecto terapéutico podría derivarse de las células madre hematopoiéticas con capacidad de transdiferenciación. El papel de otros tipos celulares troncales de adulto de origen no hematopoiético en la regeneración de tejidos es menos conocido; hasta recientemente no se ha podido disponer de marcadores de superficie específicos que permitan la valoración de la capacidad de transdiferenciación de estas células.

Comentamos brevemente la situación de los estudios de terapia celular en algunos órganos y enfermedades diferentes marcando que aún no se puede interpretar si los resultados positivos obteni-

dos, que permiten en algunos casos pasar a tratar enfermos en fase clínica, se deben a mecanismos de transdiferenciación o a otros procesos implicados en regeneración celular o a una mera corrección de alguna de las sintomatologías patológicas. Viene pues exigida una gran prudencia que permita al científico trabajar sin crear falsas expectativas en los enfermos.

Regeneración del corazón tras infarto

La inyección directa al corazón lesionado de una población enriquecida en células madre hematopoiéticas participan en la regeneración del músculo cardiaco, y conducen a una mejoría manifiesta de la función cardiaca. El factor estimulante de la colonia de granulocitos, moviliza las células madre de la médula ósea y tiene efecto protector, posiblemente por facilitar través de la migración de células al corazón. El músculo esquelético contiene una potente población de células miogénicas con la capacidad de regenerar músculo y sangre *in vivo* (Jackson K A, Mi T, Goodell M A (1999) Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14482–14486). Cuando los mioblastos esqueléticos se inyectan en músculo cardiaco inducen la función cardiaca y la capacidad de ejercicio, posiblemente por fusionarse.

14 Theise N D, Nimmakayalu M, Gardner R, Illei PB, Morgan G, Teperman L, et al. (2000) Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*, 2, 11–16.

15 Horwitz E M, Prockop D J, Fitzpatrick L A, Koo W W K, Gordon P L, Neel M, et al. (1999) Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 5, 309–313.

Recientemente Nadal-Ginard ha descrito que el miocardio dispone de células troncales que son capaces de llevar a cabo la regeneración cardíaca a través de su estimulación *in situ* con un factor de crecimiento hepático, la cardiotropina.

Actualmente se emplea para la regeneración del corazón tanto células madre de la médula ósea (Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Colletta M, et al. (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 528-530) como con células inmaduras (mioblastos) procedentes de una biopsia muscular del propio paciente (Menasche P, Hagege A A, Scorsin M, et al. (2001) Myoblast transplantation for heart failure. *Lancet* 357, 279-280), y se estudia el uso de las de la grasa e incluso de mezcla de más de un tipo. Está en estudio, en fase clínica, los posibles efectos adversos y el protocolo quirúrgico para la introducción de las células.

Enfermedades degenerativas del cerebro

El cerebro contiene en diferentes zonas en las que están presentes células troncales con capacidad de diferenciarse a neuronas específicas; tienen el potencial de diferenciarse en tipos celulares múlti-

ples del cerebro, principalmente oligodendrocitos, astrocitos, y neuronas, lo que les da una ventaja terapéutica más amplia sobre las células progenitoras comprometidas. Se necesitan experimentos ulteriores que determinen si el potencial de transdiferenciación de las células madre neuronales humanas reside en clones específicos, o define este tipo celular en general. Sin embargo, se cuenta con varios conocimientos de importancia:

- Las células endoteliales parecen ser un componente fundamental del nicho de las células troncales nerviosas y por ello su cultivo con factores de crecimiento podría ser de futuro tratamiento de sustitución para patologías neurodegenerativas. Quin Shen ha mostrado que las endoteliales liberan factores solubles que estimulan la autoregeneración de las neuronales, inhiben su diferenciación y fomentan la producción de neuronas y el factor FGF2, que promueve la proliferación de las células troncales neuronales requiere los factores endoteliales para el proceso de autoregeneración (*Scienceexpress* 2004/10.1126.1095505).

- Las células troncales de la médula ósea transplantadas pueden migrar al cerebro y diferenciarse en células que expresan proteínas específicas de células neuronales, y a células troncales neu-

rales *in vitro* (Mezey E, Chandross K J, Harta G, Maki R A, McKercher S R (2000) Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science*, 290, 1779-1782; Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM (2000) From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science*, 290,1775-1779; Sánchez-Ramos J, Song S, Cardozo-Pelaez F, et al. (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro *Exp Neurol*. 164, 247-256; Woodbury D, Schwarz EJ, Prockop DJ, Black IB. (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res*. 15, 364-370). Parece deseable que los procedimientos de terapia regenerativa se dirijan hacia la restauración directa de las células en el organismo, al menos ante lesiones neuronales en enfermedades degenerativas del sistema nervioso. Es importante poder restaurar las zonas afectadas, haciendo proliferar y diferenciar *in situ* las células madre neurales; o dirigir al cerebro células troncales de la médula ósea convertidas en neurales.

- En la enfermedad de Parkinson, se ha puesto de manifiesto que el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) protege a las neuronas dopaminérgicas de la muerte celular por lo que se ha admi-

nistrado ya a pacientes, con resultados positivos. (Gill SS, et al. Direct brain infusion of glial cell line derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nature Medicine* 2003; DOI: 10.1038/nm850).

- Las células troncales dentales derivadas de la pulpa dental producen en cultivo factores neurotróficos que promueven la supervivencia de las células nerviosas. El equipo de Nosrat analiza actualmente su potencial terapéutico al inyectarlas en el cerebro como opción para el Parkinson y en lesiones de la médula ósea.

- Los resultados obtenidos en modelos animales de primates Luquin R, et al. and López-Barneo J. (1999) Recovery of chronic parkinsonism monkeys by autotransplants of carotid body cell aggregates. *Neuron* 22, 743-755), permiten sugerir que el autotransplante de cuerpo carotídeo podría ser una técnica útil en el tratamiento de algunos pacientes con la enfermedad de Parkinson.

- En la esclerosis múltiple las propias células atacan y destruyen la vaina de mielina de los axones de las neuronas. Se ha conseguido en ratón (Pluchino S, Quattrini A, Brambilla E, Gritti A, et al. (2003) Injection of adult neurospheres induces recovery in a chronic model of multiple sclerosis. *Nature* 422,688-694) que células madre neurales ayuden a reparar el daño

en la área de la inflamación; entraron en las zonas desmielinizadas y se diferenciaron en precursoras de los oligodendrocitos que producen mielina en las zonas dañadas desmielinizadas.

Diabetes del tipo 1

Las células de los islotes transplantados, o los posibles implantes de células derivadas de las troncales, antes o después, volvieron a verse afectadas por la reacción autoinmune, por lo que se persigue erradicar la causa. En marzo de 2003 se ha dado un paso esencial en este sentido: las células troncales de la médula ósea de ratón transformadas y transferidas a otro animal han repoblado *in vivo* los islotes pancreáticos de Langerhans; estas células son productoras de insulina y liberan la hormona de forma dependiente de glucosa (Janus A, Holz GG, Theise N D, Hussain MA (2003) In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J. Clin. Invest.* 111, 843–850; Lee VM and Stoffel M. (2003) Bone marrow: An extra-pancreatic hideout for the elusive pancreatic stem cell? *J. Clin. Invest.* 111, 799–801). La aplicación de terapia celular a pacientes con diabetes tipo 1 exigirá que previamente se confirmen los resultados en modelos animales.

Metaboloopatías

Las células madre del cordón umbilical pueden infiltrar el tejido cardíaco dañado y transformarse en células cardíacas necesarias para la reparación. Así pues las células de la sangre del cordón no se limitan a la formación de sangre y del sistema inmune sino que pueden diferenciarse dentro del cerebro, hígado y osteocitos. Producen las enzimas que originan las metaboloopatías raras, como el síndrome de San Filippo B, que falta la enzima necesaria para sintetizar azúcares complejos y los subproductos se acumulan en órganos vitales como hígado, corazón y cerebro y causan muerte celular.

El síndrome de Hurler, la forma más grave de mucopolisacaridosis de tipo 1 por falta de la I-iduronidasa se inició el trasplante en 1981 y hasta ahora se han tratado 300, con una supervivencia del 85% (Staba et al. (2004) *J N Engl J Med* 350 1953-1934).

Es obvio que no todas las enfermedades degenerativas pueden ser tratadas de igual forma, el tipo de órgano y la causa de la alteración celular exige abordajes diferentes. Por otra parte, el conocimiento de los procesos de transdiferenciación o de la función reparadora es aún escaso; se desconocen aspectos claves de los mecanismos, cómo la función que desempe-

ña la fusión celular¹⁶. Por ello, urge potenciar la investigación básica que acompañe y se adelante a una aplicación clínica, que necesariamente debe ser en pacientes en último recurso, pero que no debe ser condenada a una espera indefinida.

5. Células troncales derivadas de embriones

En el embrión de pocos días existen células que tienen la capacidad de dar origen a cualquier tipo celular embrionario o extra-embionario¹⁷. Las células de la masa celular interna del blastocisto tienen el potencial de contribuir a cualquier linaje pero no cualquier tipo, y por ello se les denomina *pluripotentes*. En el embrión en desarrollo estas células son realmente sólo células progenitoras, o precursoras, es decir se multiplican limitadamente antes de diferenciarse y contribuyen con ello a todos los tejidos adultos. Sin embargo, cuando se extraen del ambiente embrionario natural y se cultivan *in vitro*, proliferan sin limitaciones al tiempo que mantienen el potencial de generar células derivadas de cualquiera

de los linajes¹⁸, expresando genes restringidos de las células troncales de las tres capas germinales¹⁹.

El mantenimiento de la pluripotencia de las células de la masa celular interna es debido a la alta expresión del gen *Oct-4*. *In vivo*, la presencia de **células embrionarias pluripotentes con capacidad de autorenovación es transitoria; si se agregan a un embrión de ocho células o a un blastocisto se genera una quimera**. Y se obtienen líneas celulares inmortalizadas manteniendo las propiedades de células troncales por cultivo *in vitro* de las células de la masa interna del blastocisto en presencia de citoquinas apropiadas²⁰.

Cuando estas células se aíslan del blastocisto humano y se cultivan *in vitro* se multiplican y confluyen hasta la formación de dos tipos de agregados dependiendo de las condiciones: 'neuroesferas' o agregados flotantes que contienen progenitores neuronales y los llamados «cuerpos embrioides» que son agregados con apariencia de «quistes», con las tres

16 Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz D M, Nakano Y, et al. (2002) Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature*, 416, 542-545; Ying Q L, Nichols J, Evans EP, Smith AG (2002) Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*, 416, 545-548.

17 Thomson JA, Odorico JS (2000) Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Trends in Biotechnology* 18, 53-57.

18 Rathjen PD, Lake J, Whyatt LM et al. (1998) Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biology and gene therapy. *Reprod. Fertil. Dev.*; 10:31-47; Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995; 7:862-869.

19 Schuldiner M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J. et al. (2000) Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; 97:11307-11312.

20 Amit M, Carpenter M K, Inokuma M S et al. (2000) Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev Biol* 227, 271-278.

capas germinales²¹ y en alguno de los cuales se observó la presencia de cardiomiocitos contráctiles. Se han conseguido líneas celulares a partir de las del embrión temprano que retienen las propiedades de proliferar, generar teratomas *in vivo*, y diferenciarse a células que derivan de las tres capas germinales²². Es decir, a *partir de las líneas inmortalizadas de las células embrionarias es posible generar linajes específicos de tejido*²³.

El control de la proliferación es de suyo dependiente del estado de maduración. De hecho, el fallo del control de la proliferación (o de la muerte celular programada) constituye la raíz misma de la aparición de un proceso tumoral. Las células troncales embrionarias mantienen la telomerasa²⁴, por lo que se replican de forma indefinida. Esta enzima mantiene la longitud de los telómeros y con ello evita el freno natural a una proliferación

continua. Diversos tipos de células tumorales tienen altos niveles de esta enzima. También se ha descrito²⁵ que la proteína nucleostemina es abundante en células con capacidad de proliferación y autoregeneración como las células troncales embrionarias y algunas líneas tumorales. Esta proteína descontrola el ciclo celular por enlazarse a las p53. Las células troncales neurales de adulto tienen también esta proteína expresada, pero su nivel decae drásticamente cuando aparece la nestina que marca la terminación del ciclo celular y el inicio de la diferenciación. En ellas, como corresponde a una célula troncal de adulto aunque sea inmadura, el control de la proliferación está en equilibrio con la diferenciación.

6. Interés terapéutico de las células troncales embrionarias, e interés como material de partida para investigación

Por su propia naturaleza la utilización de las células derivadas de las de la masa interna del blastocisto presenta un problema inherente: por proceder de un embrión de días, con toda la potencia para dar un organismo entero, tienen un crecimiento muy potente y con ello la facilidad de transformarse en células tumorales. Esto exige como prerequisite para la terapia celular garantizar la diferenciación de todas las células pluripo-

21 Itskovitz-Eldor, J., Schuldinger, M., Karsenti, D. et al. (2000) Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies comprising the three embryonic germ layers. *Mol. Med.* 6, 88-95.

22 Amit M, Carpenter M K, Inokuma M S, Chiu C P, Harris C P, Waknitz M A, Itskovitz-Eldor J, Thomson J A (2000) Clonally derived human embryonic stem cells lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental Biology* 227, 271-278; Schuldinger M, Yanuka O, Itskovitz-Eldor J, Melton DA, Benvenisty N (2000) Effects of eight growth factors on the differentiation of cells derived from human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 11307-11312.

23 Palacios R, et al. (1995) *In vitro* generation of hematopoietic stem cells from an embryonic stem cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7530-7534.

24 Betts D H, King W A (1999) Telomerase activity and telomere detection during early bovine development. *Dev. Genet* 25, 397-403.

25 Tsai R Y L, McKay R D E (2002). A nucleolar mechanism controlling cell proliferation in stem cells and cancer cells. *Genes & Development* 16, 2991-3003.

tenciales y la purificación de las células cultivadas derivadas de ellas de manera que se asegure que no existe ninguna célula con capacidad tumoral. Esto podría llegar a lograrse, lo mismo que se podrá conseguir resolver previamente el problema del rechazo del injerto para no mantener necesariamente al paciente de por vida sometido a una inmunosupresión. También es necesario garantizar la seguridad del procedimiento de trasplante de células embrionarias diferenciadas y la identificación de cualquier posibilidad de incluir células no diferenciadas.

En todo caso, la racionalidad terapéutica es distorsionada con este abordaje: es un exceso de intervención, con todos los riesgos que conlleva, partir de una célula del inicio de la construcción de un organismo para desarrollarla *in vitro* –sin que forme parte del organismo–, imitando artificialmente el delicado y complejo proceso vital del desarrollo embrionario; las alteraciones de una célula en cultivo, incluso una vez inmortalizadas como línea celular²⁶, son muy frecuentes. Y por su propia naturaleza, las inmaduras células troncales embrionarias son inestables y máximo al provenir de blastocis-

tos fecundados y cultivados *in vitro*²⁷. Por todo ello, puede afirmarse que la terapia celular no necesita los embriones preoces para obtener células madre²⁸. Las dificultades expuestas suponen que estas células no son aptas para su uso directo en la regeneración de órganos y tejidos. Las células troncales de adulto ocupan ese lugar terapéutico y las células madre embrionarias no compiten con ellas.

No es ético, es mentir, apoyarse en las expectativas creadas a los enfermos para presionar la promoción de una investigación que podrá tener como resultado conocimientos de interés, pero no es de directa aplicación terapéutica. Tampoco es cierto que una investigación de ese tipo exija necesariamente el uso de los embriones humanos vivos criopreservados a consecuencia de las prácticas de la fecundación *in vitro*. Y menos aún es cierto que la curación de graves enfermedades sin solución actualmente requiera pasar por la creación de embriones clónicos del paciente a fin de obtener del blastocisto clónico las células embrionarias con la misma dotación genética del paciente.

Analizamos brevemente la investigación con células troncales de origen embrionario, para acabar apuntando las al-

26 Draper J, Smith K, Gokhale P, Moore H, Maltby E, Johnson J, et al. (2004) Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 22, 53-54; Rideout WM, Eggan K, Jaenisch R (2001) Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293,1094-1098; Humpherrys D. et al. (2001) Epigenetic Instability in ES Cells and cloned mice. *Science* 293, 95-97.

27 Fernández-González R, Moreira P, Bilbao A, Jimenez A, et al. (2004) Long-term effect of *in vitro* culture of mouse embryos with serum on mRNA expression of imprinting genes, development, and behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 5880-5885.

28 Sherley JL (2003) Embryos aren't essential to stem-cell research. *Nature* 423, 381.

ternativas que se podrían emplear para conseguir células troncales humanas sin requerir embriones.

Las células embrionarias humanas, y el desarrollo de líneas celulares derivadas de ellas son de interés para el estudio de los procesos de diferenciación celular y organogénesis que tienen lugar durante el desarrollo embrionario humano; y por tanto, para el conocimiento de las bases moleculares y celulares de diversas enfermedades o malformaciones. Su peculiar punto en el equilibrio proliferación/diferenciación pueden aportar conocimiento valioso para comprender mejor el proceso tumoral. Ahora bien, la racionalidad biomédica exige trabajar con células de animales, limitando los estudios con las humanas a aquellos mecanismos que exijan especificidad de especie. Las líneas celulares derivadas de células madre humanas, tanto embrionarias como de adulto, se plantean como un material de partida de gran interés para estudios de toxicología de fármacos. De nuevo las de adulto ofrecen la ventaja de poderse preparar a partir de células madre de pacientes con la enfermedad que se trata de paliar.

Queda por justificar si otros usos de estas células embrionarias (no directamente terapéuticos) son imprescindibles, o al menos convenientes, para investigaciones de interés en el campo de la salud humana. La preparación de líneas celulares a partir de embriones puede ser de utilidad pero no parece técnicamente fácil poder aprovechar la reserva acumulada en crioconservación, debido a que la

mayor parte se congelaron en fase de una, dos o muy pocas células, por lo que no tienen aún las células madre de la masa interna del embrión en fase de blastocisto. Desde el punto de vista ético no habría especial problema, si los progenitores los donan, que después de la muerte por descongelación sin reanimación, sus células puedan ser usadas para generar líneas o para diversos estudios acerca de esas primeras fases del desarrollo y de la influencia de la fecundación *in vitro*; siempre y cuando, además, estuviera legalmente prohibido que volvieran a crioconservarse embriones como sobrantes sin destino.

Otro factor a tener en cuenta, además del problema ético que supone destruir embriones humanos aunque no tengan posibilidad de vivir, y aunque sea para conseguir material biológico para uso terapéutico, es que los embriones procedentes de las clínicas de reproducción asistida presentan riesgos adicionales: provienen normalmente de parejas con problemas de fertilidad, causada a veces por alteraciones genéticas y se conoce que presentan con frecuencia, por efecto de la misma manipulación de su fecundación, alteraciones y malformaciones. Esto significa que el rigor científico no puede admitir, como garantizados y de aplicación generalizada, los conocimientos que se obtuvieran del estudio con células de estos embriones. Habría que evaluar las consecuencias de las posibles alteraciones en el genoma de dichas células. Es decir, no parece que sean un buen material de partida para investigación.

Líneas celulares derivadas de blastocistos humanos para uso de investigación

En Agosto de 2001 se creó el registro con unas 70 líneas celulares derivadas antes de esta fecha y mantenido por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos con el fin de autorizar la investigación en células troncales embrionarias con fondos provenientes del gobierno federal de los Estados Unidos. Estas líneas provienen de laboratorios de Estados Unidos, Australia, Suecia, India e Israel (NIH Human Embryonic Stem Cell Registry; <http://escr.nih.gov>). En el 2004, se publica (Draper JS (2004) Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 22, 53-54) en el Reino Unido cambios en el cariotipo que implican el cromosoma 17 en tres líneas en cinco ocasiones independientes y en el cromosoma 12. Estos cambios en ambos cromosomas suponen una ventaja adaptativa en las células en la multiplicación e indiferenciación, lo que exige revisar su potencial uso en posibles futuras terapias.

En marzo de 2004, En el laboratorio de Melton han conseguido 17 nuevas líneas de células troncales embrionarias que están disponibles para investigación (publica-

do el 25 de marzo en *New England Journal of Medicine*); proceden de embriones humanos congelados del HHMI de Fecundación asistida de Boston.

Por otra parte las células madre obtenidas por partenogénesis (Cyno-1) continúan diferenciándose dos años después y con replicación indefinida (PNAS 2003 DOI 10.1073/pnas2034195100).

7. Alternativas al uso de embriones como origen de células inmaduras

Comienzan a aparecer datos que muestran que existen posibilidades de obtener, para investigación, células del tipo de las embrionarias sin obtenerlas de la masa celular interna de blastocistos humanos vivos. La racionalidad científica exige que si se considera de interés una investigación se prevea la fuente del material de partida. Si puede ser animal superior como un mamífero, si se puede realizar con células mejor con una línea inmortalizada, o si puede ser con un órgano o tejido mejor que con el animal entero y en tal caso bien anestesiado y sacrificado, etc. Si han de ser células humanas la fuente de obtención requiera obviamente más requisitos.

Inicialmente se planteó no ya el uso de embriones sobrantes y crioconservados, sino la obtención ex profeso de embriones clónicos del paciente; se trataba así de evitar el rechazo inmunológico que podría presentar un paciente hacia las

células, derivadas de un blatocisco ajeno, si se llegaran a obtener células troncales embrionarias con capacidad de usarse en terapia regenerativa. Es lo que se ha llamado «clonación terapéutica». Diversos estudios han mostrado que la dificultad de conseguir que un nuclóvulo de primate se reprogramme a cigoto, y dé inicio al desarrollo de un blastocito, es muy alta. Datos recientes apuntan a la posibilidad de obtener lo que podríamos llamar «blastocistos embrioides» bien por clonación o bien por partenogénesis; es decir, conjuntos celulares embrioides, con morfología similar al blastocisto y que permite una diferenciación de algunas de las células derivadas del nuclóvulo o del óvulo activado, con peculiaridades de troncal embrionaria²⁹. El equipo de Vrana logró en el 2003 la inmortalización de células troncales obtenidas por partenogénesis de primate, que continúa proliferando y diferenciándose en diversos tipos después de dos años (DOI: 10.1073/pnas2034195100). Aunque no se trata en ninguno de los dos casos de un verdadero embrión, por lo tanto de un ser humano, hoy por hoy, se precisaría la donación de un número elevado de óvulos

para garantizar tanto la consecución de un experimento de transplante de células clónicas del paciente o de células obtenidas por activación de un óvulo. La donación de los mismos supone una limitación del material biológico de partida más aún cuando la mujer donante debe ser sometida a un proceso de multiovulación que no es inocuo para ella. Para paliar este problema se ha planteado el uso de óvulos de coneja como donantes de los factores necesarios para regular la expresión de genes del inicio del desarrollo³⁰.

Una posible alternativa como fuente de células del tipo troncal embrionario es la modificación de factores citoplasmáticos reguladores de la expresión de genes que permitiera rejuvenecer o revertir la diferenciación de células del organismo adulto para reconducirlas en el sentido que se precisara para una potencial terapia humana. Se trataría de imitar los mismos mecanismos que usan en el organismo las células troncales de un tejido, o de la médula ósea, o de la sangre para regenerar las dañadas. Así, por transdiferenciación, se han convertido células de la piel en linfocitos T necesarios para tratar al paciente; para ello, a los fibroblastos le hicieron una serie de poros microscópicos en las membranas y los sumergieron durante una a dos horas en un extracto de linfocitos T y después cerraron los poros con calcio. Proteínas de las células T capaces de activar espe-

29 Trounson A (2002) The genesis of embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* 20, 237-238; Kaufman MH, Robertson EJ, Handyside AH, Evans MJ (1983) Establishment of pluripotential cell lines from haploid mouse embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* 73, 249-261; Cibelli JB, Grant KA, Chapman KB, Cunniff K, Worst T, Green HL, Walker SJ, Gutin PH, Vilner L, Tabar V, Dominko T, Kane J, Wettstein PJ, Lanza RP, Studer L, Vrana KE, West MD (2002) Parthenogenetic stem cells in nonhuman primates. *Science* 295, 819.

30 Solter D. (2003) New paths to human ES cells? *Nature Biotechnology* 10, 1154-1155.

cíficamente los genes de los linfocitos emigran a las células de la piel y activan en ellas estos genes específicos, mientras que los propios de la piel quedan inactivados. Los fibroblastos expresan los receptores característicos de los linfocitos al cabo de unas semanas³¹. Este experimento muestra que no es necesario revertirlas hasta el estado embrionario sino que también in vitro se transforman o transdiferencian. Es posible que la vida media no sea tan larga como si se reprograman al estado embrionario, pero tampoco tendrán el peligro de transformarse en células tumorales. Y, la hibridación por fusión de una célula troncal y una de

adulto permite rejuvenecer una célula y dotarla de capacidad regenerativa³².

No se trata ahora de enjuiciar las alternativas que se vislumbran para conseguir células del tipo de las troncales de embriones humanos sin generarlos y destruirlos, sino indicar que si fueran necesarias e imprescindibles para la investigación biomédica, este material de partida para los ensayos ha de ser conseguido por inmortalización de líneas celulares troncales de adulto, o por reversión o rejuvenecimiento de estas o incluso por manipulación de gametos humanos que no supongan constitución de un individuo humano.

31 Häkelien AN, Landsverk HB, Robl JM, Skálhegg BS, Collas P (2002) Reprogramming fibroblasts to express T-cell functions using cell extracts. *Nature Biotechnology* 20, 460-466.

32 Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N y Tada T (2002) Nuclear reprogramming on somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 11, 1553-1558; Dennis C. reports (2003) Take a cell, any cell... *Nature* 426, 490-491.