

CÉLULAS TRONCALES REJUVENECIDAS Y EL FINAL DE LA CLONACIÓN

STEM REJUVENATED CELLS AND THE END OF THE HUMAN CLONING

Natalia López Moratalla

Departamento de Bioquímica

Universidad de Navarra

E-mail: natalialm@unav.es

Resumen

El pasado 7 de junio la revista *Nature* reconoce imposibilidad de obtener células troncales para investigación, mediante el ineficiente proceso de transferencia del núcleo de una célula de adulto a oocitos humanos. Al mismo tiempo acepta que ese tipo celular, tan buscado y sometido a fraude, se ha obtenido limpiamente por el procedimiento contrario; esto es, reprogramando hacia atrás, mediante ingeniería genética, una célula de adulto. Se estrena para el caso nueva revista *Cell Stem Cell* y *Nature Reports Stem Cells*, publica online una serie de comentarios con los que se intenta mantener el término clonación para lo que es una fecundación convencional. Y es que es embrión humano, resultante de tal fecundación *in vitro*, será de nuevo el material de partida de otros intentos, inútiles e innecesarios, en el empeño por mantener viva la investigación consumidora de embriones humanos. La investigación biomédica, ética y racional, sigue su curso alejada de los intereses ideológicos y políticos que la empañarían.

Palabras clave: Reprogramación. Células troncales. Oocitos humanos.

Abstract

Nature has recently accepted (June 7th, 2007) the impossibility to obtain stem cells through nuclear transference to human eggs. They state also that this type of cell, so often looked for and subjected to fraud, has been achieved reprogramming backwards through genetic engineering an adult cell. A new journal, *Cell Stem Cell*, has just appeared publishing this achievement. And *Nature Reports Stem Cells* publishes online a series of comments pretending to preserve the term cloning to indicate for something, which is really a conventional fertilization. The human embryo from such in vitro fertilization will be again the starting material of useless and unneeded attempts to keep alive a research. on human embryos. Biomedical research, faithful to ethical and rational principles, keeps working on paths removed from illegitimate ideological and political interests.

Key words: Reprogramming; stem cells; human eggs.

1. Sin embriones, ni óvulos

Desde su inicio la investigación con células troncales ha distinguido, enfrentado por ideología y política, a los científicos y a la sociedad, entre células troncales del adulto (AS) y células troncales procedentes de embriones (ES) o de tipo embrionario obtenidas por transferencia nuclear, SCNT.

Las células madre de adulto están siendo usadas en terapia regenerativa.¹ Constituyen una reserva cuya función natural es acudir al sitio de la lesión y regenerar las células diferenciadas destruidas por la enfermedad. Se trabaja intensamente para encontrar el mejor sistema de potenciar su función sin manipularlas fuera del organismo, sino conduciéndolas al lugar de la lesión. Algunas resultan escasas para investigar y además mueren pronto fuera de su nicho. Por esto, desde

hace unos años, se busca «rejuvenecerlas» para aumentar su pluripotencialidad y poder trabajar con ellas.

Yamanaka² es el pionero de la apuesta por conseguir células de un adulto, tan rejuvenecidas que tengan las mismas propiedades que las procedentes de embriones, pero sin usar ni embriones ni óvulos, sino por mera ingeniería genética. Les ha llamado células iPS (del inglés «células madre pluripotentes inducidas»). Ha introducido en fibroblastos de ratón genes (Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4) que regulan la expresión de otros genes (Fbxo15) y permiten, que siguiendo el programa de desarrollo, se forman los diferentes tipos de células del cuerpo, en el sitio y en el momento adecuado; las señales para ello (que constituyen el patrón de metilación de las citosinas) van dejando marcas sobre el material genético.

1 López-Moratalla, N. «Racionalidad de la investigación con células troncales embrionarias». *Cuad. Bioét.* XVII, 327-347, 2006/3ª.

2 Takahashi K. & Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676 (2006).

Las células así obtenidas (Fbx15-iPS) son similares a las embrionarias en morfología. Proliferan, forman teratomas como las ES, pero difieren en el patrón de metilación del DNA, expresión de algunos genes, y no forman quimeras cuando se introducen en un blastocisto. Esto es, el ratón que se desarrolla no lleva la dotación genética de la célula fibroblasto.

Sin embargo, el equipo ha continuado los experimentos, mostrando en 2007 que las iPS completan plenamente todas las propiedades de las ES si seleccionan la expresión del gen *Nanog*; las *Nanog*-iPS de macho forman quimeras e incluso pueden transmitirlo a la línea germinal³, dando espermios. El equipo de Konrad Hochedlinger⁴ ha mostrado que de forma similar los fibroblastos rejuvenecidos procedente de la hembra dan lugar en las quimeras a la producción de óvulos.

En otro trabajo, en el que participa el experto en clonación de ratones Jaenisch⁵, usan la misma tecnología para rejuvenecer las células y comprueban que la regresión es total. Este equipo ha usado las células iPS para introducirlas en un embrión en

su estado inicial y que llegue a nacer un ratón quimera (que posee células con el DNA de las iPS y de las del embrión) y que puede transmitir el material de las iPS a la descendencia. Son similares a las ES en metilación del DNA, expresión de genes y estado de la cromatina.

Estos trabajos marcan un hito en la apuesta por las células troncales de uno u otro tipo. En efecto, las células de la piel de ratones pueden ser reprogramadas «hacia atrás», al estado embrionario, sin necesidad de usar embriones ni usar óvulos; no fue muy eficaz y necesitaba otras de tipo ES. Las células iPS se convierten ahora en la panacea para investigación biomédica y toxicología de drogas. Obviamente, aunque se está en el comienzo, las iPS sustituyen a las ES y a las obtenidas por transferencia nuclear a oocitos, las SCNT.

Para un potencial uso terapéutico habría que asegurar que con la reprogramación no se haya producido una expresión alterada de genes. Es decir, la pluripotencialidad de estas iPS no las convierte en células para terapia regenerativa, ya que el gen *cMyc* se ha sobrexpresado en la progenie de los ratones y algunos desarrollan tumores. Afortunadamente no es necesario para la terapia regenerativa rejuvenecer hasta tal punto las células troncales de adulto.

2. Sin óvulos, pero con cigotos

Se ha descrito en ratón una transferencia de material genético⁶ de una célula de

3 Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Germline competency of mouse induced pluripotent stem cells selected for *Nanog* expression. *Nature* doi: 10.1038/05934 (2007).

4 Maherali, N., Sridharan, R. Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K. M. Stadtfeld, R. Yachechko, J. Tchiew, R. Jaenisch K. Plath. K. Hochedlinger. Global epigenetic remodeling in directly reprogrammed fibroblasts. *Cell Stem Cell* 1, 55–70, July 2007 doi:10.1016/j.stem.2007.05.014.

5 Wernig M. A.Meissner, R. Foreman, T. Brambrink, M. Ku, K.Hochedlinger, B. E. Bernstein, R. Jaenisch. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. doi:10.1038/nature05944. (2007).

6 Egli D., J.Rosains, G. Birkhoff, K. Eggan. Developmental reprogramming after chromosome transfer into mitotic mouse zygotes. *Nature* 447, 679–685 (2007).

adulto a un cigoto (embrión recién fecundado) anormal con el impreciso nombre de «clonación por cromosomas». Hasta ahora la clonación animal y la producción de líneas de células madre embrionarias por transferencia nuclear (NTSC), se habían llevado a cabo introduciendo el núcleo somático en oocitos meióticos, sin éxito. Se ha visto que los cigotos temporalmente detenidos en mitosis permiten reprogramar el núcleo transferido mejor que los oocitos. Obviamente no se ha realizado con ello una clonación, ya que sólo se realiza un cambio de cromosomas de una célula somática a un embrión ya generado por fecundación.

Se plantea de nuevo la obtención de copias de células de un humano, ahora reciclando embriones humanos anormales, «desechables» en la fecundación *in vitro*. No estamos ante un mero intento de resucitar la utopía de la «clonación terapéutica», sino de eludir la insalvable barrera natural a la generación de un clon de primates, cambiando la dotación genética de un embrión por la del adulto. El resultado, si se consigue conservar los factores no genéticos esenciales para el adecuado proceso de reprogramación, sería un embrión y no el simple conglomerado de células que resulta cuando el receptor de un núcleo de célula somática de primate es un óvulo de primate no fecundado. El equipo de Egli ha mostrado que la pérdida de factores cruciales podría ser minimizada o eliminada si la transferencia nuclear se realiza a un cigoto cuando tanto el donante como el cigoto están temporalmente detenidos en la mitosis con los cromosomas condensados y

posteriormente se les permite alinearse. Es la primera vez que se usa un citoplasma mitótico como receptor del núcleo transferido desde una célula somática.

Así pues, cigotos (óvulos fecundados) de ratón son capaces de reprogramar el genoma de una célula adulta. Esto plantea de nuevo la vieja cuestión acerca de si la manipulación del DNA permite o no el desarrollo de un organismo completo. En términos de eficacia este sistema no es mejor que los anteriores. Más aún, es más grave desde el punto de vista ético pues usan un cigoto para la transferencia en vez de usar un oocito. Pero se afirma que se usaran embriones defectuosos generados en una fecundación con polispermia⁷.

Después de 10 años de intentos de clonación, a fin de obtener células con dotación elegida mediante la técnica de transferencia, se pasa del uso de óvulos al uso de cigotos. Pero ya no se puede denominar clonación a esta técnica; no lo es. Tampoco se conoce, ni se prevé un uso terapéutico. Sin embargo, rápidamente el «lobby pro células embrionarias»⁸ vuelve a buscar parejas que quieran donar para investigación sus embriones sobrantes⁹. Se dice que serán usados los

7 Se calcula que el 3-5% de los cigotos humanos contienen set de cromosomas supernumerarios (Aoki, V. W. *et al.* *J. Exp. Clin. Assist. Reprod.* 2, 3 (2005).

8 Cfr. López-Moratalla, N. «El lobby de las células embrionarias, telón de fondo del fraude de la clonación». *Cuad. Bioét.* XVII, 2006/1^a.

9 Cortes, J.L., Antiñolo, G., Martínez, L., Cobo, F., Barnie, A., Zapata, A., Menéndez, P. Spanish Stem Cell Bank Interviews Examine the Interest of Couples in Donating Surplus Human IVF Embryos for Stem Cell Research, *Cell Stem Cell* (2007), doi:10.1016/j.stem.2007.03.001

cigotos triploides que dan lugar a fetos deformes (llamados molas hidatiformes parciales) que generalmente son abortos espontáneos en el primer trimestre de gestación o que nunca sobreviven mucho tiempo tras el nacimiento. Pero aún en este caso, se estaría usando un embrión para destruirlo y generar otro.

Heindryckx¹⁰ y col. han publicado un primer trabajo en humano que pretende paliar las dificultades que existen para disponer de oocitos humanos maduros; han madurado *in vitro* (IVM) los oocitos de la vesícula germinal (GV), y usado cigotos con fallos de fecundación (FF oocitos) para obtener células ES por transferencia nuclear. En ningún caso llegaron a conseguir un blastocisto.

No se conoce bien el patrón de expresión de genes del oocito al cigoto humano¹¹ y hay pequeños RNAs llamados microRNAs (miRNAs) que son cruciales para regular la traducción de mRNA en el desarrollo embrionario de mamíferos¹², lo que impide diseñar una posible técnica

de clonación. Es significativo que el oocito humano necesite mucho más tiempo (20 horas) para completar la primera división meiotica que el oocito de ratón que requiere solamente entre 6 ó 12 horas; los procesos que son suficientes para el ratón no lo son para los humanos.

3. Libertad de investigación

La libertad de investigación del científico debe, es un derecho, estar protegida contra las interferencias ideológicas y políticas de quienes diseñan las prioridades de las líneas de investigación y de los fondos públicos para ello, de modo sectario.

Es muy grave para la ciencia que una revista científica, clasificada como la primera, o de las primeras, por la calidad de muchos de los artículos que publica adquiera un destacado índice de impacto por mecanismos ajenos a la ciencia misma.

La decisión de los científicos en una encrucijada, como la que se plantea con la obtención de células reprogramadas para estudios de los procesos iniciales del desarrollo embrionario, debe estar presidida por una fuerte racionalidad, capaz de distinguir células de individuos, primates de otros mamíferos y hombres de primates. Una racionalidad que no permite, destruir ni manipular seres humanos, para conseguir unos conocimientos sin duda valiosos. La ética de la investigación exige saber esperar el momento en que ese tipo de conocimiento pueda ser obtenido, a partir de materiales biológicos técnica y éticamente adecuados.

10 Heindryckx, B., P. De Sutter, J. Gerris, M. Dhont and J. Van der Elst. Embryo development after successful somatic cell nuclear transfer to in vitro matured human germinal vesicle oocytes. Human Reproduction Vol.22, No.7 pp. 1982-1990, 2007 doi:10.1093/humrep/dem106

11 Stitzel, M. L. & Seydoux, G. Regulation of the oocyte-to-zygote transition. Science 316, 407-408 (2007).

12 Zhang, P., Kerkela, E., Skottman, H., Levkov, L., Kivinen, K., Lahesmaa, R. *et al.* Distinct sets of developmentally regulated genes that are expressed by human oocytes and human embryonic stem cells. Fertil. Steril. 87, 677-690 (2007). Tang, F., Kaneda, M., O'Carroll, D., Hajkova, P., Barton, S. C. & Sun, Y. A. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. Genes Dev. 21, 644-648 (2007).

Quimeras, células híbridas y fecundaciones híbridas

Quimera es la entidad producida por la mezcla de células de dos embriones diferentes.

Híbrido, como el mulo, es el individuo producido por la fecundación de gametos de individuos de dos diferentes especies. Se puede fundir espermios humanos y oocitos de hámster para comprobar su potencial fecundante¹³ de los espermios humanos. No se origina un híbrido, sino sólo una célula que realiza la primera división celular como oocito activado por el espermio extraño.

Citoplasmas híbridos son el resultado de transferir núcleos humanos a oocitos de mamíferos¹⁴ a fin de obtener células de tipo embrionario.

También se ha introducido núcleos de células humanas en oocitos de anfibio para estudiar mecanismos necesarios para la clonación¹⁵. Se trata pues no de crear organismos por combinación de gametos de diferentes especies sino de crear células por combinación de células, útiles en investigación. Como por ejemplo, para el estudio de enfermedades hereditarias de las que no se conoce la causa genética (esclerosis lateral amiotrófica, ALS¹⁶), o para un rastreo de drogas.

Recibido: 24-08-2007

Aceptado: 13-09-2007

13 Barros, C, González J, Herrera E. & Bustos-Obregon, E. Human sperm penetration into zona-free hamster oocytes as a test to evaluate the sperm fertilizing ability. *Andrologia*. 1, 197-210 (1979).

14 Chen, Y., He, Z.X., Liu, A., Wang, K., Mao, W.W., Chu, J.X., *et al.* Embryonic stem cells generated by nuclear transfer of human somatic nuclei into rabbit oocytes. *Cell Res*. 13, 251-263 (2003); Chang, K.H., Lim, J.M., Kang, S.K., Lee, B.C., Moon, S.Y. & Hwang, W.S. Blastocyst formation, karyotype, and mitochondrial DNA of interspecies embryos derived from nuclear transfer of human cord fibroblasts into enucleated bovine oocytes. *Fertil Steril*. 80, 1380-1387 (2003). Beaujean, N., Taylor, J.E., McGarry, M., Gardner, J.O., Wilmut, I., Loi, P., *et al.* The effect of interspecific oocytes on demethylation of sperm DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7636-7640 (2004).

15 Gurdon, J.B. From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 1-22 (2006).

16 Cleveland, D.W., & Rothstein, J.D. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 806-819 (2001).